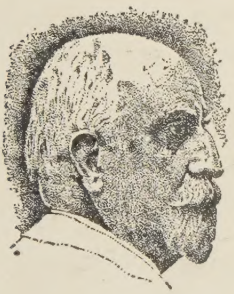
VOLUMEN 9 ABRIL-JUNIO 1956 NUM. 2

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Arnaldo Socias Amorós, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

SUMARIO

Páginas

Del pleomorfismo microbiano en productos patológicos, por *A. Socias* y *A. Portolés* 113

Una nueva variedad de *Torulopsis holmii* (Jorgensen) y estudio de sus productos metabólicos, por *Carlos Ramírez Gómez* y *Gonzalo Sierra Rico* 147

Estudio del *corn steep* y de su influencia en la fermentación alcohólica, por *María Aparicio*... 163

Una nueva especie de *Endomyces* Reess: *Endomyces ovetensis* nov. sp., por *Fernando Peláez Campomanes* y *Carlos Ramírez Gómez* 191

El aspecto estructural bioquímico y genético del bacteriófago. Revisión de conjunto (conclusión), por *Federico Beato y González* 201

Renovación de Directiva.—VII Congreso I. de Microbiología.—Actas de la Sociedad 237

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN» DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA

DEL PLEOMORFISMO MICROBIANO EN PRODUCTOS PATOLOGICOS

POR

A. Socías y A. Portolés

A) INTRODUCCION

El presente trabajo versa sobre unas investigaciones bacteriológicas donde un gran pleomorfismo es patente. Como se verá en el transcurso de la exposición, este trabajo puede considerarse una continuación del publicado en el número 4, vol. VIII de Microbiología Española con el título de «Micosis relacionadas con la antibioterapia».

Las investigaciones fueron llevadas a cabo sobre un producto patológico de naturaleza mucoide procedente de senos nasales afectos de un proceso catarral crónico, que se manifiesta con una sintomatología más intensa en determinadas épocas o condiciones. Normalmente no produce molestias, pero al coincidir con un enfriamiento o brote gripal sufre un proceso de agravación, exaltándose la sintomatología, que desaparece en el momento que tiene lugar la eliminación, por descarga, de moco cremoso, de bastante consistencia y con un color que oscila del amarillento-verdoso a amarillo anaranjado.

El análisis microscópico de frotis de este producto, nos muestra microorganismos morfológicamente bien distintos, pero que a pesar de sus diferencias, *nos dan la impresión* de estar estrechamente relacionados entre sí.

A través de siembras en diversos medios de cultivo, surgen una serie de distintos microorganismos, *superior en número* a los que deja entrever la microscopia del frotis. Así, encontramos: un bacilo que adopta diferente tamaño y disposición según el medio: un cocobacilo Gram positivo que puede pasar a ser Gram negativo de tinción débil; una levadura, un moho, que recién aislado es capaz de originar bacilos en un medio apropiado, pero que una vez repetidas las resiembras sobre el medio Czapeck-

maltosa, ya no se consigue más este fenómeno, y, por último, formas en vibrio-espirilo totalmente irregulares en tamaño, aspecto y coloración, que acaban fijándose en formas bacilares.

B) INVESTIGACION MICROBIOLOGICA

El producto patológico es recogido sobre gasa estéril en el momento de su eliminación, con las debidas precauciones para evitar contaminaciones accidentales que pudieran inducir a error en la interpretación de resultados.

Con esta sustancia mucoide se preparan frotis que se tiñen por diferentes técnicas (Gram, May Grunwald, Giemsa y Wright).

Se siembra sobre distintos medios de cultivo y en diferentes condiciones ecológicas. Así crecen una serie de colonias que, a su vez, se estudian por oportunas resiembras, según se indica en el esquema adjunto.

El estudio detallado de la exposición esquemática citada es como sigue:

I) *Frotis*

De primer momento, lo más característico en él es el acentuado polimorfismo de los microorganismos que en la preparación se encuentran; así, podemos ver entre los filamentos de moco: bacilos Gram positivos en forma de huso, maza u ovoides, en diferentes asociaciones; bacilos más delgados; cocobacilos Gram negativos; grandes formas cocáceas polimórficas Gram positivas, como las que se suelen encontrar en los casos de antibiótico-resistencia; micrococos Gram variables y cuerpos de apariencia levaduriforme (fotos 1, 2, 3, 4, y 5). Asimismo, y lo hacemos resaltar, se observan ciertos cuerpos intensamente gram positivos, cuyo tamaño permite clasificarlos en pequeños (fot. 6), medianos (fot. 7) y grandes (fot. 8); su aspecto corresponde a los observados en otros muchos productos patológicos anteriormente investigados —por ejemplo, en los frotis de granulomas tracomatosos (3)—, y parece que tienen una importante misión en el mantenimiento del polimorfismo microbiano. Para un investigador no experimentado, estos cuerpos pueden prestarse a confusión con los monocitos o linfocitos alterados de un producto patológico, mas no tienen nada que ver con ellos (fot. 9) ni con los leucocitos de la serie

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/international-microbiology_april-june-1956_9_2

granulosa, sea cual fuere su fase de alteración (fot. 10), ni con los restos celulares o masas carioplásmicas de las células disgregadas (fot. 11), ni con las células epiteliales pavimentosas (fot. 12).

Considerando primero los cuerpos más pequeños, se puede ver, ocasionalmente, cómo están rodeados de una cubierta de espesor uniforme, de aspecto mucoide (fot. 13), que se hace más patente a veces (fot. 14) y se encuentra en los primeros estados de su evolución pleomórfica, cuando el citoplasma se tiñe intensa y homogéneamente (fot. 15), y asimismo persisten mientras aparece una a modo de segmentación del citoplasma (fotos 16 y 17) para, apenas sombrear, cuando ya está terminada esta segmentación y en vías de liberarse los nuevos corpúsculos formados (fot. 18). También las de tamaño mediano presentan estas estructuras (fot. 19).

Los de gran tamaño, que pueden aparecer más o menos densos (fotos 20 y 21), presentando diversos grados de granulación, segregan una masa mucoide en la cubierta con cuerpos baciliformes (fot. 22) que pueden definitivamente quedar libres al exterior (fotos 23 y 24).

Es curioso señalar que los cuerpos globosos, medianos y pequeños sobre todo, parecen originar formas cocáceas pleomórficas Gram positivas, mientras que los grandes dan formas bacilares cortas Gram positivas, que luego aparecen como corynebacterium, encontrados tan frecuentemente como gérmenes de asociación.

Todas estas formas microbianas, que producen una primera impresión de ser especies independientes, se demuestra más tarde que guardan estrechas relaciones. Este hecho, repetidamente observado por nosotros, nos confiere un cierto hábito para que en los exámenes bacteriológicos que se presentan *intuyamos* que se trata de *momentos pleomórficos.*

II) *Cultivos*

a) *Siembra en agar común a 37° (I).*—A las veinticuatro horas crecieron tres clases de colonias en número abundante: la (Ia) pequeña elevada, brillante, de bordes enteros, integrada por cocobacilos Gram negativos muy poco teñidos (fot. 25). A las cuarenta y ocho horas se resiembra nuevamente en placa de agar común, donde se obtienen colonias más grandes (Ia_1), integradas por cocobacilos Gram negativos (fot. 26). Se resiembran por segunda vez en el mismo medio, obteniéndose los mismos bacilos pero Gram positivos, que se consideran fijados en sus caracterís-

ticas y aptos para ser clasificados. Otra colonia, la (Ib), que crece en la placa original, es pequeña, plana y blancuzca, de bordes enteros, integrada por micrococos cuyo comportamiento frente a la tinción de Gram es variable (fotos 27 y 28). Cuando se ha intentado conservar estas colonias mediante liofilización, perdieron su vitalidad y, por tanto, no se pudo seguir experimentando. Otra bien desarrollada es la (Ic), cuyo aspecto es típico de las de micrococos tipo estafilococo, pero que, sin embargo, está integrada por un germen cocáceo grande, de unas 4 micras, fuertemente gram positivo (fotos 29 y 30), como los ya observados en casos de antibiótico-resistencia, y que parecen estar estrechamente relacionados, por su aspecto morfológico, con los que resultan de la segmentación de los cuerpos globosos de pequeño tamaño, según se puede ver en las fotos 16 y 18; estas colonias también se resembraron y se sometieron a liofilización.

b) *Siembras en agar sangre a 37° (II).*—Se siguen las mismas vicisitudes que en agar común, obteniéndose los mismos gérmenes, aunque con más fácil desarrollo.

c) *Siembras en agar malta a 37° (III).*—Crecen tan sólo dos tipos de colonias en número escaso: la (IIIa), que es puntiforme, elevada, amarillenta y consistente, integrada por microorganismos de morfología vibrio-espiriloide (fotos 31 y 32), y la (IIIb), elevada, rugosa y de color gris, integrada por organismos baciliformes fuertemente Gram positivos, con tendencia a levaduriformes (fot. 33), como es lógico esperar en este medio.

d) *Siembras en agar malta a 27° (IV).*—Crecieron cuatro colonias: la (IVa), que tardó varios días en aparecer y estaba formada por un tenue velo blanquecino de aspecto micelial, pero que no llegó a desarrollarse por completo, ni adquirió la capacidad de reproducirse por resiembra. La (IVb), grisácea, rugosa, elevada, con bordes algo ondulados, que estaba integrada por un bacilo grande pleomórfico, Gram variable (aunque predominan los Gram positivos fuertes) y con granulaciones (fot. 34); esta colonia se resembró en agar común (IVb_1) y a 37° crece en veinticuatro horas, dando bacilos Gram positivos anchos, más normales que los anteriores (fot. 35), que recuerdan a los de la colonia IIIb. La colonia (IVd) da típicas levaduras, a pesar de que también se encuentran entre ellas bacilos Gram positivos; se resiembra en agar malta, donde, a 27°, crecen levaduras características (IVd_1), aunque se observan entre ellas algún bacilo Gram positivo (fotos 36 y 37), los cuales desaparecen al resembrar

nuevamente y en las mismas condiciones sobre agar malta, donde crecen tan sólo levaduras (IVd_2) (fot. 38), que, al clasificarlas, resultan ser de la especie *Cándida tropicalis*. La colonia IVc es abundante, puntiforme, elevada, amarilla y bastante consistente; está integrada por microbios *vibrio-espiriloides*, según los denominamos nosotros por la dificultad de fijar su morfología, ya que, según podemos ver (fot. 39), son microorganismos de extraordinario polimorfismo, vibriones unas veces, espiriloides otras, largos bacilos o grandes cocos las menos, e incluso también presentan elementos con tendencia levaduriforme; esta dificultad de descripción se complica con que no son definitivos en su comportamiento frente a la coloración de Gram, ya que si bien suelen ser fuertemente Gram positivos, también los hay Gram negativos, e incluso algunos de mayor tamaño presentan la parte más engrosada Gram positiva y la más delgada Gram negativa. Esta colonia (IVc) se resiembra en placa de agar malta, donde a 37° se disocia en una colonia blanca (IVc_2) elevada, perfectamente definida, de bacilos Gram positivos (fot. 40) que, al resembrarla, sigue sin variación; y otra (IVc_1) puntiforme y de características parecidas a la original, que está integrada por estos vibro-espiriloides, que parecen disminuir un poco en su complejidad morfológica (fot. 41), continuando en esta tendencia al resembrarlos en las mismas condiciones (fot. 42), para ya quedar así fijados.

e) *Siembras en Czapeck-maltosa al 3% a 25° (V).*—A los cuatro días empieza a desarrollarse un moho, que, una vez maduro y clasificado, resulta ser *Penicillium notatum* (Va) (fotos 43, 44 y 45).

Este hongo es resembrado para su aislamiento en varios medios:

1. En agar común, da colonias (Va_1) de bacilos y cocos en el primer pese, que al resembrar (Va'_1), quedan fijados en bacilos Gram positivos.

2. En agar sangre (Va_2) da colonias grandes, casi planas, de superficie más bien lisa y bordes ligeramente ondulados, en los que aparecen bacilos grandes Gram positivos, aunque hay algunos Gram negativos, pleomórficos, con tendencia filiforme, que recuerda al micelio, así como también sombras de cuerpos globosos parecidos a los ya descritos en los frotis (fot. 47 y 48). Esta colonia se resiembra en agar sangre (Va'_2) en idénticas condiciones, y se obtienen bacilos Gram positivos normales.

3. En caldo común, lo enturbia a las cuarenta y ocho horas de crecimiento a 37°, produce velo sobre la superficie, sedimento y olor putrefacto; en los frotis se observan grandes bacilos destruídos, otros normales Gram

positivos y algunos grandes aislados (fot. 50) que, resembrados en placa de agar común (Va'_3), producen bacilos normales Gram positivos (fot. 49).

La aparición de estas colonias de bacterias y cocos de primer momento podría explicarse por contaminación del moho con estas bacterias en la colonia (Va). Parece confirmar esta suposición el que, haciendo una preparación de mohos de tal colonia (Va) se observa junto a las conidias de agar común (Va'_3, producen bacilos normales Gram positivos (fot. 49).

Ahora bien: al mismo tiempo que se hacen estas siembras citadas se efectúan otras de la misma colonia (Va) sobre placas de Czapeck-maltosa (Va_4), en las que a 25° creció solamente el moho típico. Este es resembrado en caldo común (Va'_4) y no se produce crecimiento bacteriano; en Czapeck-maltosa a 37° (Va_5), y tampoco hay crecimiento bacteriano; y en agar malta a 27° (Va_6) y 37° (Va_8), así como también en agar malta glucosamina a 27° (Va_7), donde tampoco se producen crecimientos bacterianos.

En todos estos medios en que se resiembra la colonia (Va) del Penicillium, con mayor o menor rapidez crece este moho. De estas colonias se hacen resiembras en caldo común y en ninguna hubo crecimiento bacteriano.

Así, pues, las colonias bacterianas solamente se obtuvieron sobre agar común (Va_1), agar sangre (Va_2) y caldo común (Va_3) a 37°, pero no sobre agar malta ni en Czapeck-maltosa a 25°, donde solamente crecieron colonias del Penicillium.

No es fácil comprender cómo no surgieron colonias de bacterias o cocos en los medios de Czapeck y agar malta a 37°, especialmente en este último, donde estas bacterias y cocos crecen si son sembrados. Nuestra explicación es que se trata de un caso de transformación moho-bacteria que se da en agar común, agar sangre y caldo común y no en Czapeck ni en agar malta.

El fenómeno de la transformación se da espontáneamente en muchos mohos y levaduras recién aislados de ciertos medios naturales o productos patológicos.

III) *Circunstancias derivadas de la liofilización de estas células*

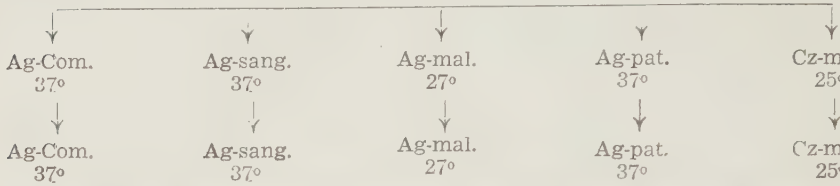
Al llegar aquí hubo necesidad de interrumpir las experiencias por encontrarnos en pleno mes de julio; entonces recurrimos a la liofilización de los siguientes microorganismos aislados sobre sus medios respectivos para una mejor conservación:

MES DE JULIO			MES DE OCTUBRE		
Medio de procedencia	Cepas	Condiciones de conservación	Siembras post. liofilización	Cepas desarrolladas	Determinación del grado de fijación de la cepa
AC 37°	Cocos grandes G+	Liofilizado sobre caldo	AC 37° a las 72 h.	Bacilos gruesos G+ (Fot. 51)	3 en t/in. cada 5 días
AC 37°	Bacilos cortos G+	Liofilizado sobre caldo	AC 37° a las 24 h.	Bacilos más largos G+ pleom. (Fot. 52)	3 en t/in. cada 5 días
AM 37°	Bacilo grande G+ esporul	Liofilizado s/agua de levad.	AC 37° a las 24 h.	Los mismos bacilos con form. filam. (Fot. 53)	3 en t/in. cada 5 días
AC 37°	Bacilo grande G+ esporul	Liofilizado sobre caldo	AC 37° a las 24 h.	Los mismos bacilos	3 en t/in. cada 5 días
AM 37°	Formas vibrio espiriloides Gram variables	Liofilizado agua de levadura	AC 37° a las 72-96 h.	Bacilos G+ (Fot. 54)	3 en t/in. cada 5 días
AM 27°	Formas vibrio espiriloides Gram variables	Liofilizado agua de levadura	AC 37° a las 72-96 h.	Bacilos G+ idénticos a los anteriores	3 en t/in. cada 5 días
AS 37°	Levadura	Liofilizado agua levadura	AM a 27° a las 48 horas	Levadura con granulaciones	3 en t/in. cada 5 días
AC 37°	Levadura	Liofilizado agua levadura	AM a 27° a las 48 horas	Levadura con granulaciones	3 en t/in. cada 5 días
AM 27°	Levadura	Liofilizado agua levadura	AM a 27° a las 48 horas	Levaduras normales	3 en t/in. cada 5 días
Zc-M 25°	Moho	Tubo cerrado			Moho normal

En este cuadro se puede ver que toda la serie de microorganismos que teníamos en un principio quedó reducida a un moho, una levadura, que ya habían sido clasificados, y a dos bacilos, que presentan, desde el punto de vista morfológico, algunas diferencias, si bien son una misma especie de B. subtilis.

Como el moho en los múltiples pases citados no fué susceptible de variación, seguimos trabajando con la levadura y los dos bacilos en cuanto a su variabilidad, con arreglo al siguiente esquema:

Microorganismo fijado sobretubo inclinado de Ag — Com. o Ag-Mal a 37° ó 27°, respec-tivamente, después de liofilización y tres pases por tubo.



Con lo que pudimos apreciar que: en agar común se obtienen bacilos Gram-positivos (fot. 55); en agar sangre, bacilos también Gram-positivos, pero algo más largos (fot. 56); en agar malta se desarrollan un poco más delgados, abundando más las formas alargadas (fot. 57); en Czapeck-maltosa se obtienen bacilos largos Gram-positivos débiles y algunas formas cortas anchas, Gram-positivo fuerte (fot. 58); y en agar patata, se forman largos filamentos fuertemente Gram-positivos, secretores de moco (fot. 59) y que a veces se ramifican (fot. 60).

Todos estos microorganismos de variada morfología proceden de los bacilos Gram-positivos crecidos en agar común a 37°, donde se originaron a partir de los microorganismos vibrio-espiriloides desarrollados en agar malta a 37° antes de la liofilización.

C) DISCUSION Y CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

De cuanto llevamos expuesto, a pocas deducciones que se hagan es fácil concluir que nos encontramos de nuevo ante un caso de pleomorfismo microbiano, y que las diferentes formas observadas guardan entre sí estrechas relaciones, como se expondrá a continuación, mediante microfotografías obtenidas en fases intermedias.

Efectivamente, por si la sola interpretación del esquema no fuera suficiente para ver que las masas globosas fuertemente Gram+, que tanta significación tenían «in vivo», también han aparecido en algunas colonias (fot. 61); de donde se puede deducir la hipótesis de que estos cuerpos son capaces de producir formas cocáceas y bacilares polimórficas y vibrio-espiriloides; estos últimos, a su vez, pueden originar formas más o menos redondeadas (fot. 62) o bacilos, después de pasar por distintas fases (fotos 63, 64, 65, 66, 67). Después de la liofilización se ve claramente que los

vibriones desaparecen para dar lugar a los bacilos, que en principio no tienen más diferencia con los otros que lo que tardaron en crecer sobre la primera placa.

Asimismo, en la microfot. 68 se ven, por otra parte, las formas cocáceas grandes fuertemente Gram-positivas, originadas a partir de los pequeños micrococos Gram-negativos que constituyen la col. (Ic), que no es capaz de volver a producirse como tal; esto ya lo hemos observado en ocasiones anteriores, precisamente en el trabajo a que se hace referencia al principio. Entre estos micrococos y los pequeños cocobacilos Gram-negativos (fot. 69) no hay apenas distinción, ni incluso en las colonias, ya que sólo se diferencian en que las de estos últimos son más brillantes, y, por tanto, pudiera pensarse en una variación de forma por crecimiento orientado a una dirección predominante, seguida de una condensación (fot. 70) que acaba de convertirlos en Gram-positivos y de mayor tamaño (fot. 71), siguiendo en su aumento (fot. 72) hasta convertirlos en gruesos bacilos (fot. 73). Este polimorfismo es tan marcado, que en algunas colonias de coco-bacilos se han encontrado formas más o menos globosas o levaduriformes (fot. 74); así como también preparaciones de levaduras en las que no faltan sombras cocobacilares y bacilares Gram-negativas (fotos 75, 76), ni otras en que la célula rota proyecta masa Gram-negativa (fot. 77), en la que quieren adivinarse siluetas bacilares. Esto es paralelo a lo que se observó en la liofilización, que los cocos grandes dieron bacilos cortos y gruesos.

A este aspecto levaduriforme también se pudiera llegar a partir de los vibriones, porque en su extraordinariamente variada morfología también se han visto formas que recuerdan a las levaduras; ahora bien: es mucho más lógico pensar en el proceso inverso, ya que, en otras ocasiones, hemos comprobado la transformación levadura-bacteria.

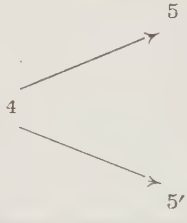
Por otra parte, el moho pudiera considerarse entre el trayecto levadura-bacilo, ya que ambas formas tienen en común la tendencia a micelio (fotos 78 y 79) por una parte, y la filamentosa (fot. 80), por otra, que se hace mucho más patente sobre agar jugo de patata (fot. 81); o también en algunas formas filamentosas derivadas de los bacilos y que precisamente habían sido sometidas a liofilización (fot. 82). Además, después de la liofilización, al pasar la levadura por agar-jugo de patata y después por Czapeck-maltosa, crecen algunas colonias con tan abundante micelio (fotos 83 y 84), que toma el aspecto de colonias de moho.

La descripción de los distintos microorganismos encontrados, las inter-

relaciones que entre ellos parecen existir, según se deriva de las diferentes imágenes conseguidas en las colonias obtenidas sobre los medios ensayados, y las circunstancias que de su aparición, desarrollo y características se derivan, así como también los antecedentes observados en otros muchos casos investigados bacteriológicamente por nosotros, nos permiten afirmar se trata de una infección provocada por un microorganismo de extraordinario polimorfismo, que bien pudiera desarrollar un ciclo vital en el organismo huésped, haciendo coincidir alguna fase de su evolución biológica con los respectivos estados de agravación del enfermo.

El hipotético ciclo en el que nosotros pensamos se expone en el esquema, indicando en trazo continuo las variaciones que nos parece tener suficientemente comprobadas y en trazo de puntos; las relaciones que, si bien no están demostradas experimentalmente, son las más lógicas, por como se enjuicia el problema y por los datos que de otras experiencias tenemos.

El conjunto de suposiciones y observaciones experimentales, que ha dado origen al precedente esquema, se fundamenta en una serie de datos que se recogen en el cuadro indicado a continuación:

CONDICIONES ECOLÓGICAS	SENTIDO DE LAS INTERRELACIONES PARA LOS DISTINTOS MICROORGANISMOS	OBSERVACIONES Y DEDUCCIONES QUE APOYAN EL SENTIDO DE LAS DISTINTAS FASES DEL ESQUEMA-HIPÓTESIS
1 En Czapeck-maltosa a 25° 2 «in vivo».	$1 \rightleftharpoons 2$	El moho creció a partir del producto patológico, por siembra directa. Los cuerpos globosos se observan en el frotis del producto patológico. En otras experiencias hemos comprobado que las conidias alteradas en fases evolutivas tomaban aspectos análogos a éste.
«in vivo»	$2 \longrightarrow 3 \longrightarrow 4$	Se puede observar fácilmente en las preparaciones obtenidas directamente del producto patológico.
Aerófilos; sobre agar-común y agar-sangre a 37°		Los micrococos y coco-bacilos Gramnegativos crecieron a partir del producto patológico y precisamente en la siembra primitiva. Por otra parte, en los frotis se ven imágenes de los cuerpos globosos segregando formas de pequeños microorganismos. Además, ambas formas (5 y 5′) aparecen en idénticas condiciones ecológicas y apenas sin diferenciación en cuanto al aspecto de sus colonias.

CONDICIONES ECOLÓGICAS	SENTIDO DE LAS INTERRELACIONES PARA LOS DISTINTOS MICROORGANISMOS	OBSERVACIONES Y DEDUCCIONES QUE APOYAN EL SENTIDO DE LAS DISTINTAS FASES DEL ESQUEMA-HIPÓTESIS
Aerófilos; sobre agar-común y agar-sangre a 37º En la fase 10, lo mismo previa liofilización de la 7'.	5'→6'→ 7'→8'→10	Los tres primeros estados se observan correlativos por sucesivas resiembras sobre los mismos medios, según se indica en el transcurso de la exposición experimental. Que la fase final es la 10, se demuestra porque al rehidratar el producto 7' liofilizado y resembrarlo en distintos medios produce bacilos, y además porque en algunos medios aparecen colonias que, aunque integradas por bacilos preferentemente, también se observan formas cocáceas y de transición (8').
Aerófilos; sobre agar-común y agar-sangre a 37º La fase 10 se produce del mismo modo que anteriormente.	5→6→7→8→9→10	Hasta la fase 9 se produce en los cultivos sobre medios normales, sin más que resembrar habitualmente en períodos de 24 a 48 h. (Col. Ia, Ia_1, Ia_{11}, etc.). La fase 10 resulta al liofilizar éstas sobre caldo común, rehidratadas al cabo de dos meses y resembrar a los mismos medios.
Aerófilos; sobre agar-malta a 27º.	A ——————→ B	No cabe ninguna duda, puesto que se trata de las mismas levaduras, que en determinadas condiciones forman más fácilmente pseudomicelio.
Microaerófilos; sobre agar-malta a 37º. También se obtienen a 27º, pero morfología menos típica. La fase 10 se obtiene en agar común a 37º, previa liofilización.	C→D→E→F→ G→H→I→10	Se pueden considerar como formas abortadas de duración limitada, que deben su origen a no tener a su disposición determinadas sustancias del organismo humano que permitieran su evolución completa; por eso crecen sobre un medio poco apto para formas bacilares, bueno para levaduras y aumentando más su polimorfismo a 37º, que es, por otra parte, t.ª poco propicia a las levaduras; por lo que se ve, se trata de unas formas intermedias que, además de desarrollarse pobremente, van disminuyendo su complejidad de morfología a medida que se van resembrando sobre agarmalta (de la C a la I), para después de dos meses de permanecer liofilizados sobre agua de levadura, crecer en forma bacilar sobre agar-común, previa rehidratación.

CONDICIONES ECOLÓGICAS	SENTIDO DE LAS INTERRELACIONES PARA LOS DISTINTOS MICROORGANISMOS	OBSERVACIONES Y DEDUCCIONES QUE APOYAN EL SENTIDO DE LAS DISTINTAS FASES DEL ESQUEMA-HIPÓTESIS
Aerófilos sobre agar-común, agar-malta y agar-jugo de patata a 37°.	10 → 11 → 12 → 13	Las formas de la fase 11 se observan frecuentemente en las colonias bacilares estudiadas. La fase 12 se ha visto en las colonias resultantes de la liofilización de la 10, y la 13 se produjo cuando los bacilos anteriores se resembraban sobre agar-jugo de patata (1, 2).
Aerófilos; sobre agar-malta y Czapeck-maltosa a 27°	1 .....→ A	Dado que las colonias levaduriformes, después de pasadas por agar-jugo de patata, son capaces de producir sobre Czapeck-maltosa colonias con micelio aéreo tan desarrollado que las da aspecto fungiforme, nos parece que el sitio más lógico para ellas en el ciclo es a continuación del moho, ya que además, es más fácil pensar que las primeras se derivan del segundo.
Aero-microaerofilos; sobre agar-malta a 27 y 37°.	B .....→ C	La relación levadura ⟶ vibrio espirilo puede admitirse aunque solamente sea por razones de morfología y por aparecer en idénticas condiciones ecológicas.
Aerófilos; sobre agar jugo de patata a 37°.	13 .....→ 1	Puesto que el moho recién aislado del organismo es capaz de producir bacilos en determinadas circunstancias, y por otra parte en los segundos se observa una tendencia filamentosa y ramificada a la vez que un engrosamiento extraordinario de la pared, no nos repugna la idea de cerrar este doble ciclo con esta suposición.

D) RESUMEN

Se ha realizado una investigación bacteriológica en un proceso infeccioso microbiano, del que se aislan y caracterizan los microorganismos que en él intervienen. Intuímos la presencia de un ciclo biológico bacteriano, en el que —bien diferenciadas morfológicamente— se identifican, por una parte: un micrococo polimorfo Gram-variable, un cocobacilo

Gram-negativo, un bacilo pleomórfico Gram-positivo y un microorganismo vibrio-espiriloide Gram-variable, que, por ser las cuatro formas de tránsito, posiblemente pierden poco a poco la capacidad de reproducción según su especie. Por otra parte: bacilos subtilis, especie final en que convergen todas las descritas en su reproducción clónica antes o después de la liofilización, una especie de Cándida tropicalis y otra de Penicillium notatum.

Se señala nuevamente, en la discusión, lo interesante de este pleomorfismo —ya observado anteriormente en las investigaciones de los autores— y se establece la hipótesis del ciclo biológico que se indica esquemáticamente, a la vez que se hacen las oportunas consideraciones acerca de sus distintas fases.

Se presentan abundantes microfotografías, que constituyen la indiscutible prueba gráfica de este pleomorfismo, cuyo conocimiento en estos últimos años es cada vez más patente.

E) SUMMARY

In this paper the authors describe a very clear case of bacterial pleomorfism. From a infectious process in the nasal sinus they isolate some microorganisms which seem have close relationships betwen them.

They also study the different morphology of these organisms «in vitro» and identify them: A species of *Penicillium notatum,* a species of *Candida tropicalis* and several ones of *Bacillus subtilis.*

A micrococcaceae and a cocchobacillar polymorphic forms and a vibrio-spirilloid microorganism were isolated from the same pathological product. These three species did not keep their morphological characteristics after lyophilisation but they appeared as bacillar forms.

F) BIBLIOGRAFIA

(1) A. Socias. Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal, V (2), 455, 1946.
(2) A. Socias. Microb. Españ., II (2), 95, 1949.
(3) A. Socias. Rev. de San. e Hig. Púb., 18 (7), 469, 1944.

INDICE DE LAMINAS

MICROFOT. 1, 2, 3, 4, 5.

Distintas imágenes de frotis del producto patológico, en las que se observan bacilos y cocos de variada morfología y coloración, así como también cuerpos globosos fuertemente Gram positivos y de tamaño variable.

MICROFOT. 6.

Cuerpos globosos de tamaño pequeño.

MICROFOT. 7.

Cuerpos globosos de tamaño mediano.

MICROFOT. 8.

Cuerpos globosos de tamaño grande.

MICROFOT. 9.

Monocito y linfocito alterados.

MICROFOT. 10.

Leucocito de la serie neutrófila alterado.

MICROFOT. 11.

Células epiteliales y carioplasmacelular aislado.

MICROFOT. 12.

Células epiteliales pavimentosas, leucocitos y filamentos de moco.

MICROFOT. 13.

Cuerpo globoso sin segmentar, rodeado de halo Gram-negativo.

MICROFOT. 14.

Cuerpo globoso en la fase que precede a lá segmentación.

MICROFOT. 15.

Cuerpo globoso en plena evolución.

MICROFOT. 16.

Cuerpos globosos Gram-positivos que aparecen segmentados y se corresponden perfectamente con los otros macizos sin dividir.

MICROFOT. 17.

Otros cuerpos globosos en distintas fases de segmentación.

MICROFOT. 18.

Formas cocáceas grandes que resultan de la segmentación.

MICROFOT. 19.

Cuerpo globoso de tamaño mediano en fase de destrucción.

MICROFOT. 20 y 21.

Cuerpos globosos de gran tamaño, fuertemente Gram-positivos y de aspecto granuloso.

MICROFOT. 22, 23 y 24.

Cuerpos globosos de gran tamaño segregando cuerpos baciliformes.

MICROFOT. 25.
Cocobacilo Gram-negativo de tinción débil de la col. Ia.

MICROFOT. 26.
Cocobacilo Gram-negativo de la col. Ia_1.

MICROFOT. 27 y 28.
Micrococo de tinción Gram-negativo variable de la col. Ib.

MICROFOT. 29 y 30.
Cocos pleomórficos fuertemente Gram-positivos, análogos a las formas cocáceas observadas en otros casos y que parecen relacionarse con los elementos resultantes de la segmentación de los cuerpos globosos (Col. Ic.).

MICROFOT. 31 y 32.
Microorganismos de morfología vibrio-espiriloide y de tinción variable (Col. IIIa.).

MICROFOT. 33.
Bacilo grande Gram-positivo, con tendencia levaduriforme (Col. IIIb).

MICROFOT. 34.
Bacilo Gram-positivo, pleomórfico, con algunas granulaciones (Col. IVb.).

MICROFOT. 35.
Bacilos Gram-positivos, procedentes de los anteriores (Col. IVb_1).

MICROFOT. 36 y 37.
Levaduras con granulaciones y algunas formas bacilares (Col. IVd_1).

MICROFOT. 38.
Células de Cándida tropicalis (Col. IVd_2).

MICROFOT. 39.
Polimorfismo vibrio-espiriloide Gram-variable (Col. IVc).

MICROFOT. 40.
Bacilos Gram-positivos de la Col. IVc_2.

MICROFOT. 41 y 42.
Microorganismos vibrio-espiriloides de la Col IVc_1 y derivadas, en los que se puede observar va disminuyendo la complejidad morfológica.

MICROFOT. 43, 44, 45 y 46.
Penicillium notatum: colonia sobre Czapeck-maltosa, preparaciones de micelio teñidas por azul Cotton y frotis.

MICROFOT. 47 y 48.
Sombras de cuerpos globosos y bacilos Gram-positivos con tendencia filiforme, en la Col. Va_2.

MICROFOT. 49.
Bacilos de tendencia filamentosa (Col. Va_3).

MICROFOT. 50.
Bacilos destruidos y otros normales fuertemente Gram-positivos (Col. Va_3).

MICROFOT. 51.

Gruesos bacilos y esporas que resultan de la liofilización de los cocos grandes pleomórficos Gram-positivos.

MICROFOT. 52.

Bacilos polimorfos resultantes de la liofilización de los bacilos cortos Gram-positivos.

MICROFOT. 53.

Formas filamentosas procedentes de la liofilización de bacilos grandes, esporulados, Gram-positivos.

MICROFOT. 54.

Bacilos Gram-positivos, obtenidos al resembrar el producto liofilizado de los vibrio-espirilos.

MICROFOT. 55.

Bacilos Gram-positivos, fijados sobre agar-común.

MICROFOT. 56.

Bacilos Gram-positivos, fijados sobre agar-sangre.

MICROFOT. 57.

Los mismos bacilos, sobre agar-malta.

MICROFOT. 58.

Idem, sobre Czapeck-maltosa.

MICROFOT. 59.

Idem, sobre agar-jugo de patata.

MICROFOT. 60.

Ramificaciones de los filamentos bacilares gruesos, obtenidos sobre agar-jugo. de patata al resembrar.

MICROFORT. 61.

Bacilo pleomórfico Gram-positivo variable, entre los que se ven formas Gram-negativas redondeadas y una forma globosa.

MICROFOT. 62.

Microorganismos de tendencia levaduriforme encontrados entre los vibrio-espirilos.

MICROFOT. 63 y 64.

Distintas fases de vibrio-espirilos en su tendencia a formar bacilos, obtenidas por sucesivas resiembras.

MICROFOT. 65, 66 y 67.

Bacilos polimorfos, Gram-positivos, obtenidos a partir del producto liofilizado de los vibrio-espirilos.

MICROFOT. 68.

Formas cocáceas grandes, Gram-positivas, entre las que se aprecian otras mucho más pequeñas Gram-negativas, débilmente teñidas.

MICROFOT. 69.

Coco-bacilos pequeños, Gram-negativos.

MICROFOT. 70.

Los coco-bacilos anteriores después de resembrarlos en el mismo medio.

MICROFOT. 71.

Los mismos, después de dos resiembras sucesivas, cada 48 h., en el mismo medio.

MICROFOT. 72 y 73.

Los gérmenes anteriores en las fases finales de su evolución.

MICROFOT. 74.

Entre los cocobacilos Gram-negativos se observa la presencia de organismos globosos o levaduriformes.

MICROFOT. 75 y 76.

Frotis correspondiente a colonia de levaduras, entre cuyas células, algunas alteradas y con granulaciones, se encuentran ogarnismos cocobacilares Gram-negativos de tinción débil.

MICROFOT. 77.

Levaduras en fase avanzada de destrucción, que parece proyectar masa celular Gram-negativa.

MICROFOT. 78 y 79.

Micelios levaduriformes.

MICROFOT. 80.

Tendencia filamentosa de los bacilos.

MICROFOT. 81.

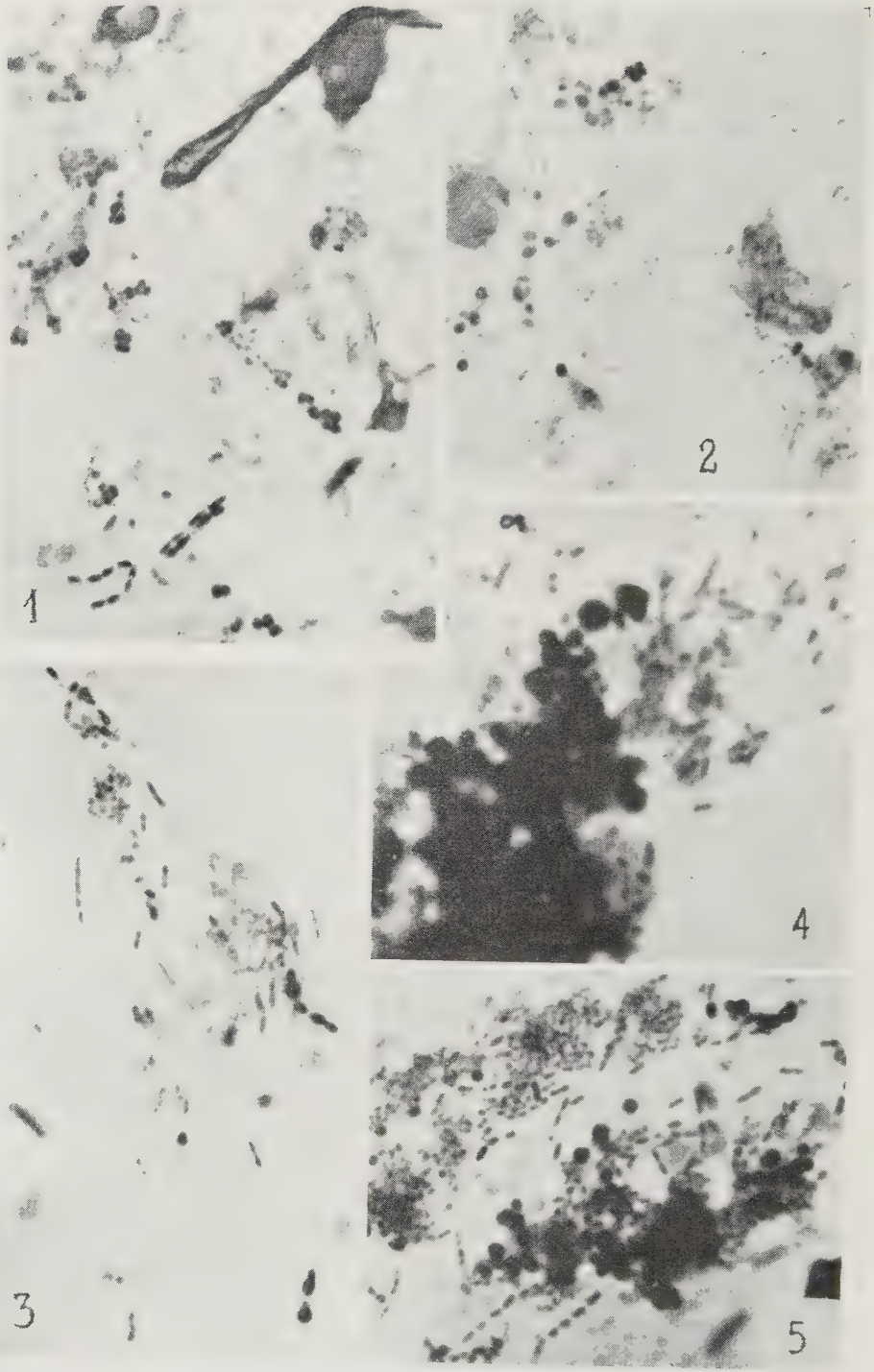
Imagen filamentos ramificada de los mismos bacilos crecidos sobre agar-jugo de patata.

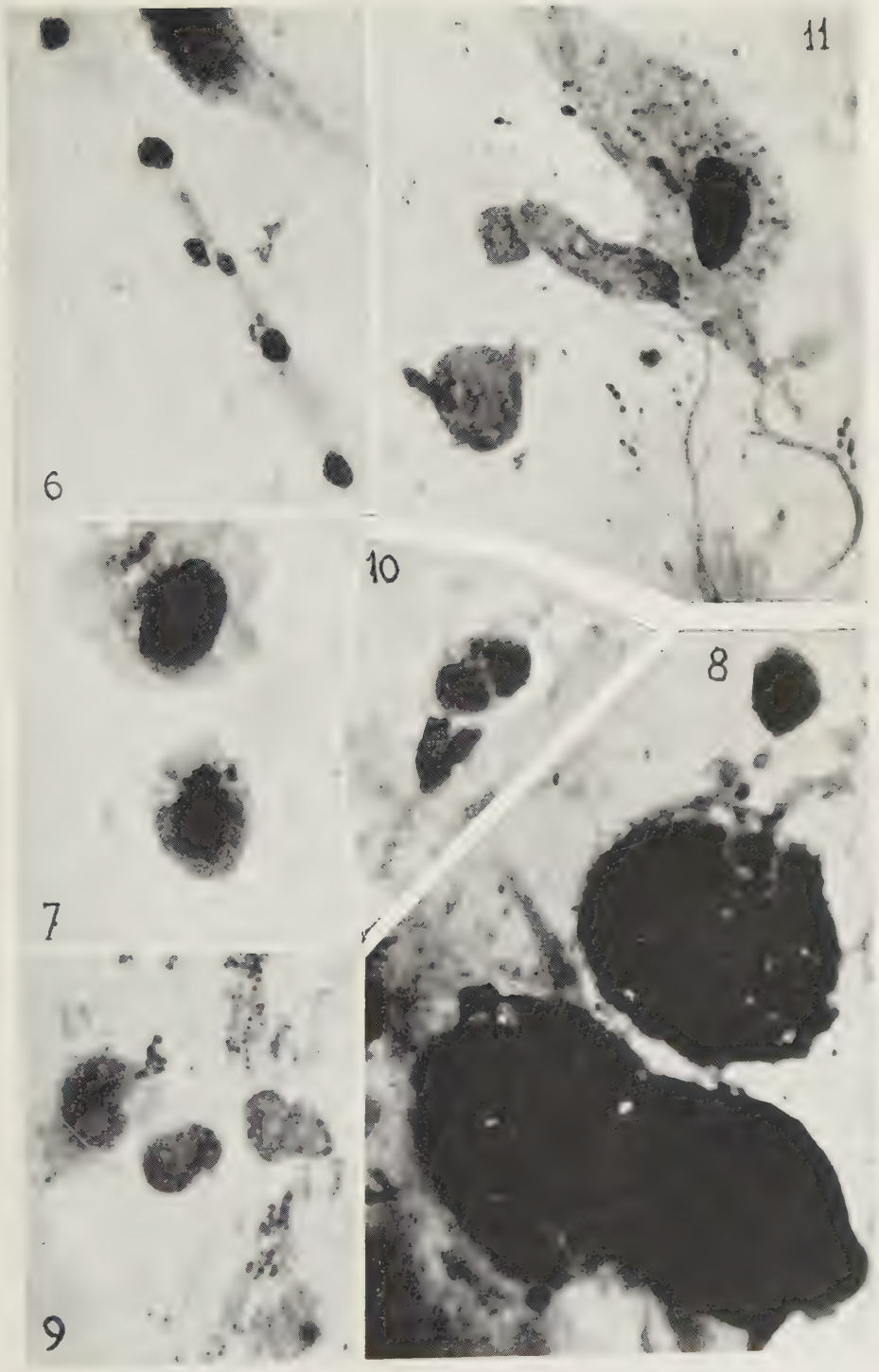
MICROFOT. 82.

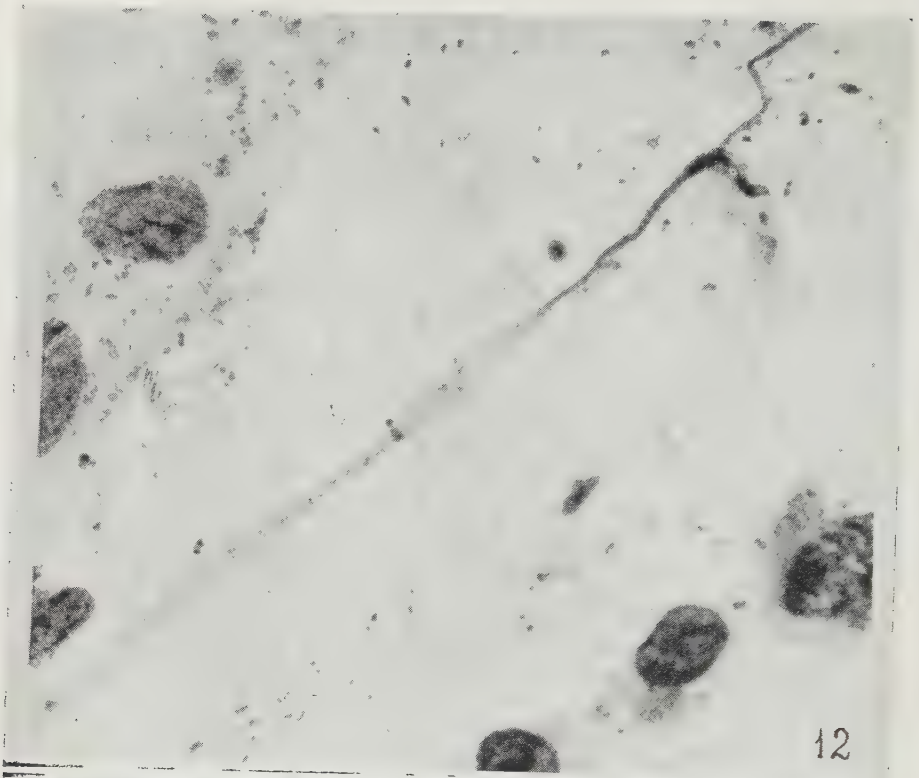
Formas filamentosas obtenidas sobre agar-malta, a partir de los bacilos liofilizados.

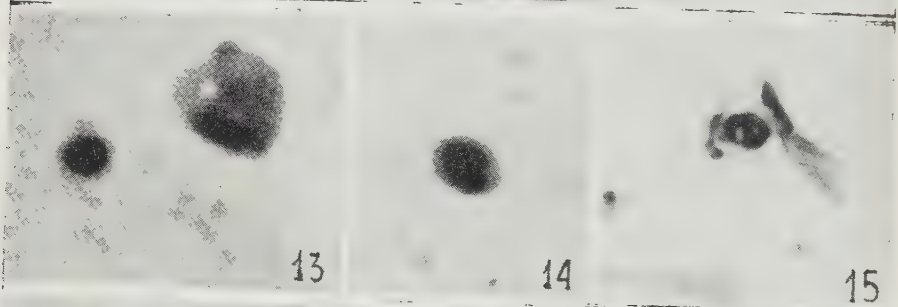
MICROFOT. 83 y 84.

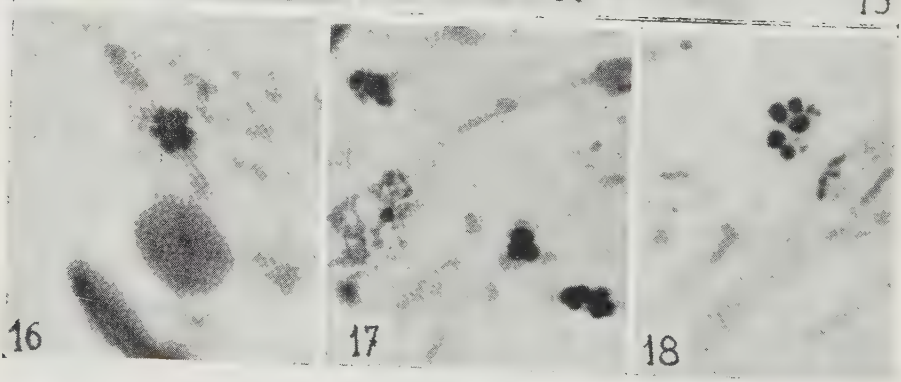
Placas de levaduras obtenidas sobre Czapeck-maltosa, después de liofilizadas. Se iluminan de dos maneras distintas, para poner bien de manifiesto su aspecto micelial.

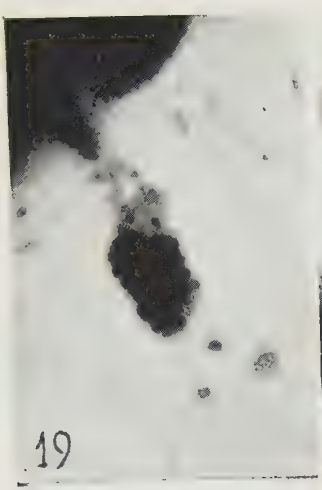

1
2
3
4
5

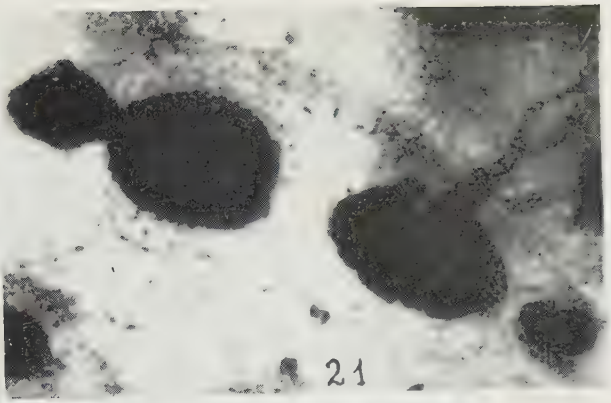

6
11
10
8
7
9

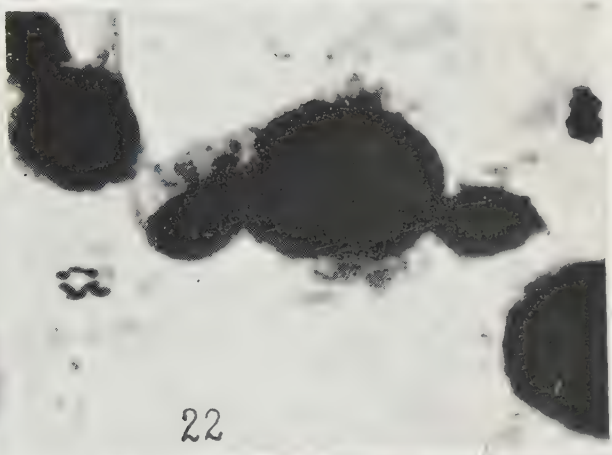

12

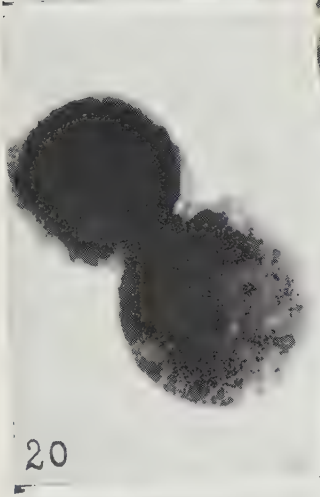

13
14
15

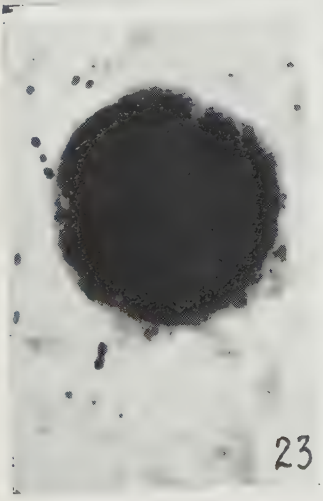

16
17
18

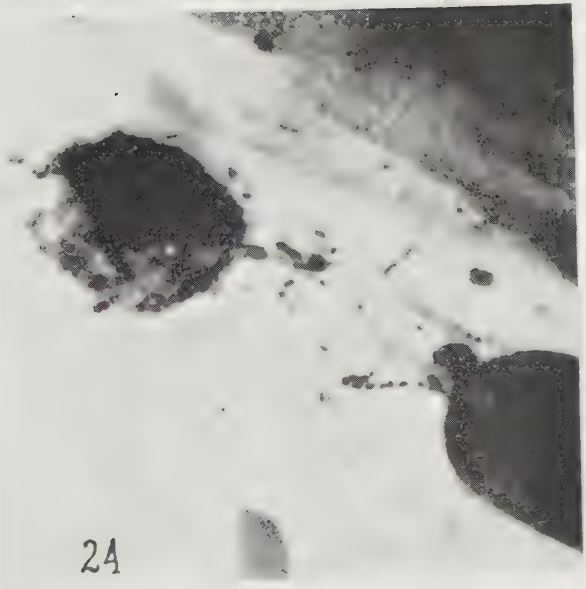

19

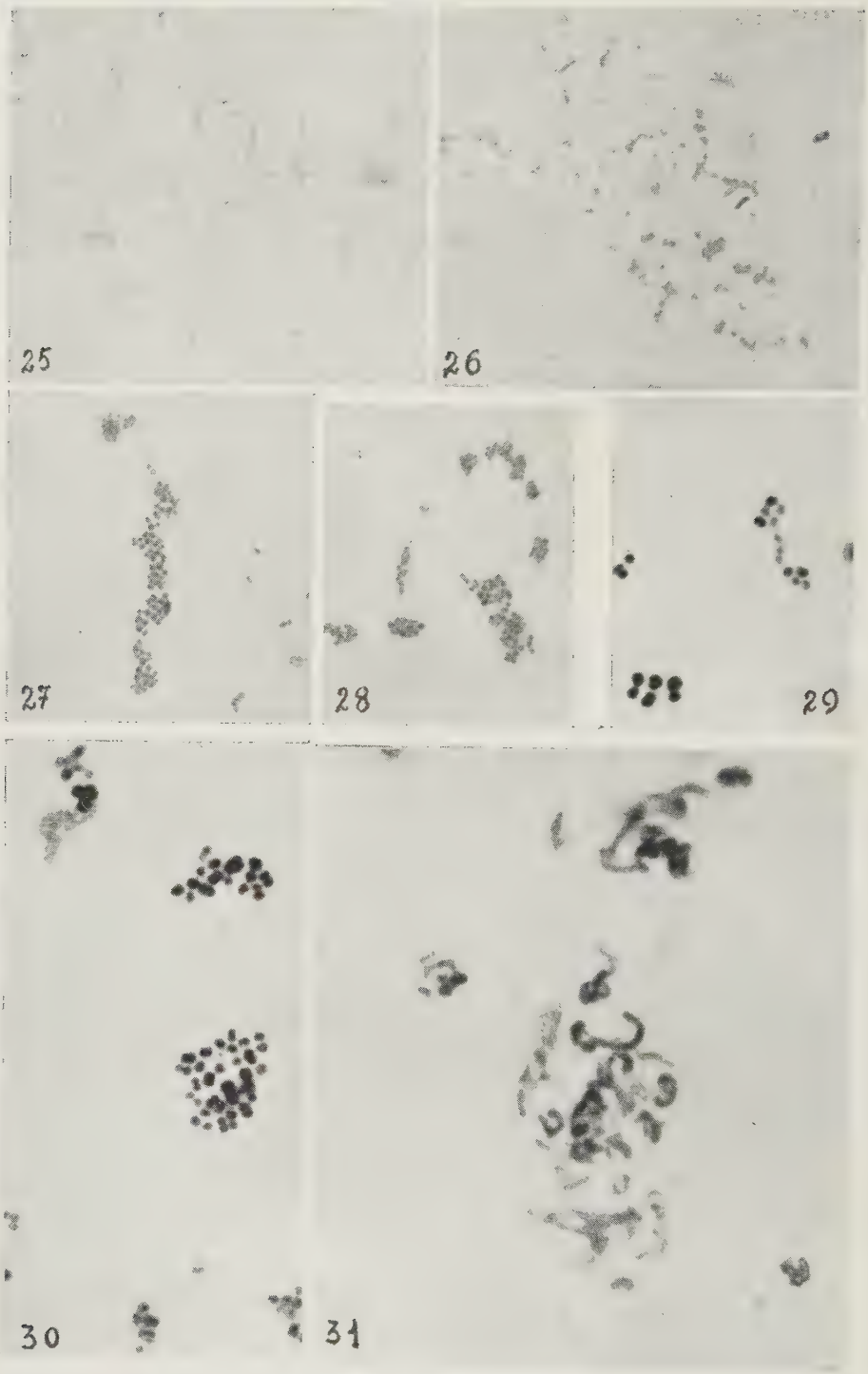

21

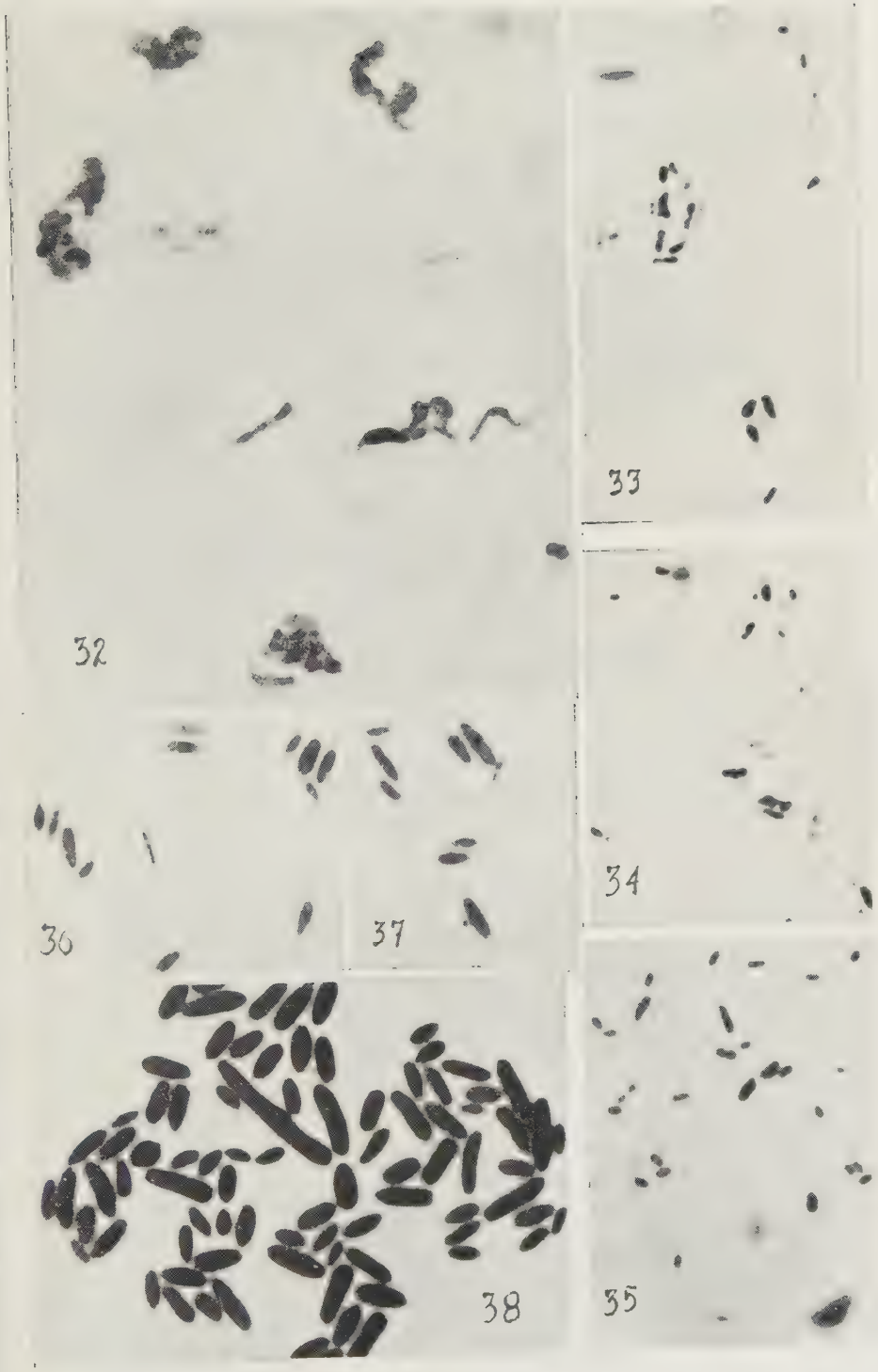

22


20

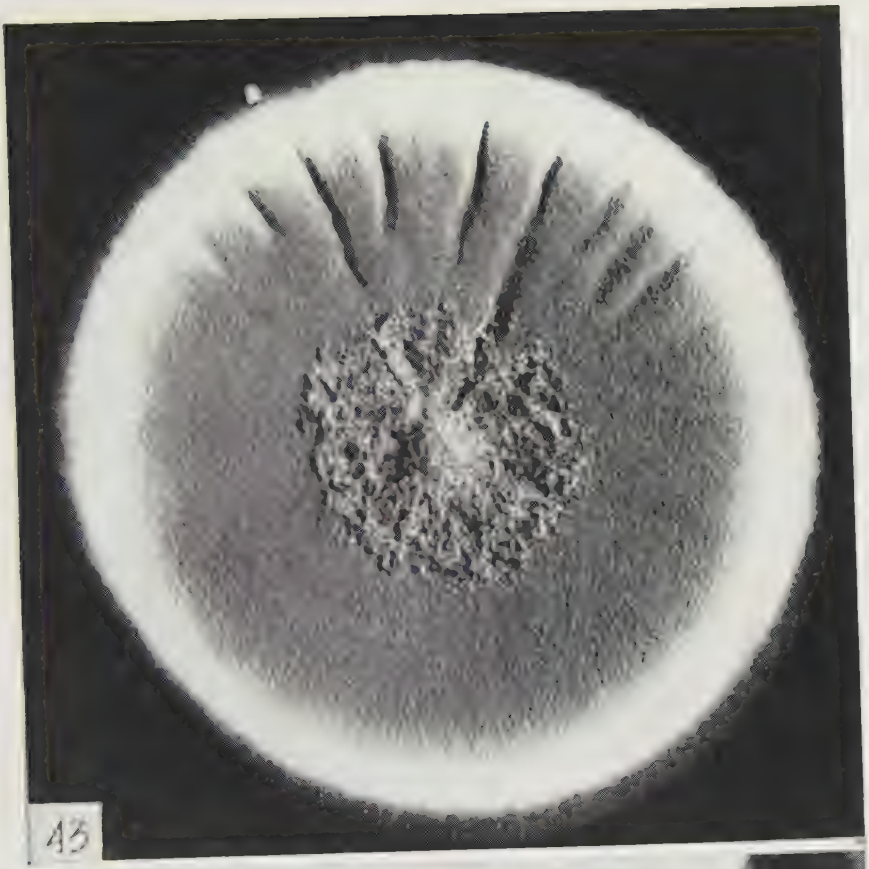

23


24


25
26
27
28
29
30
31

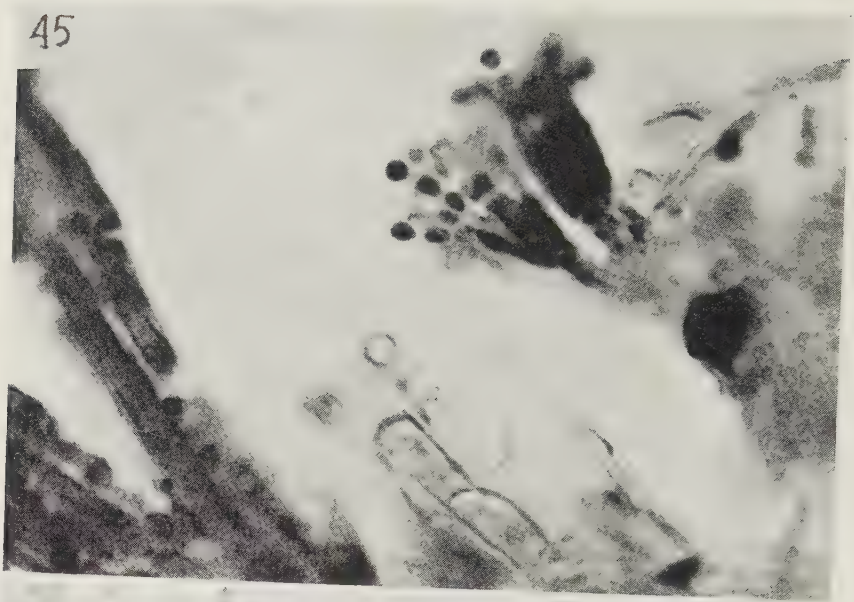

32
33
34
35
36
37
38

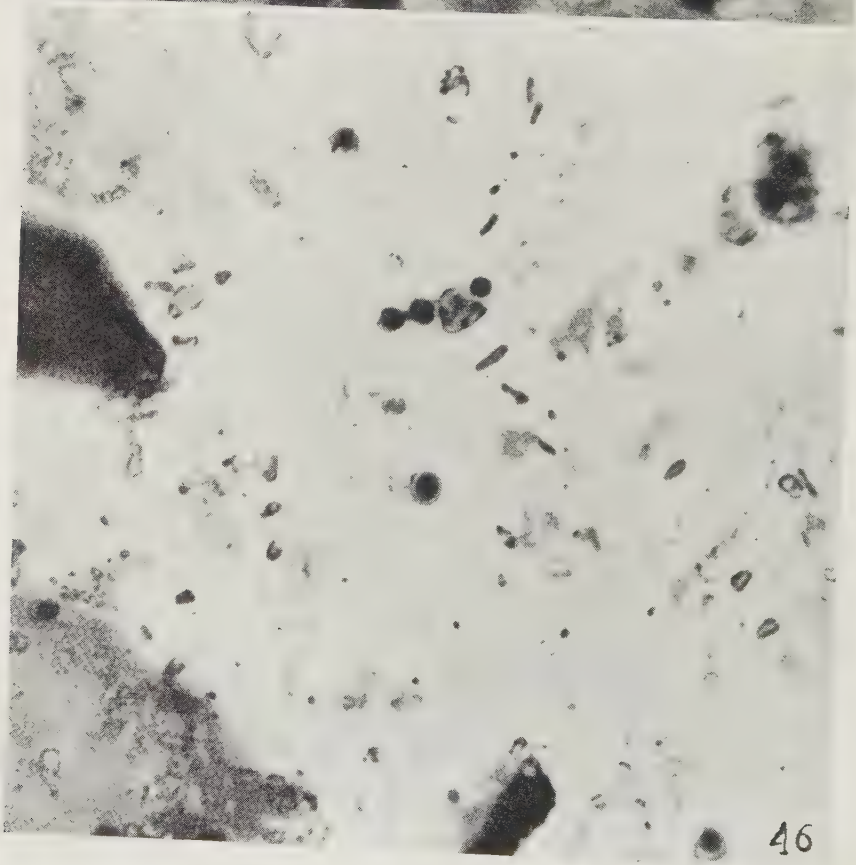
39
40
42
41

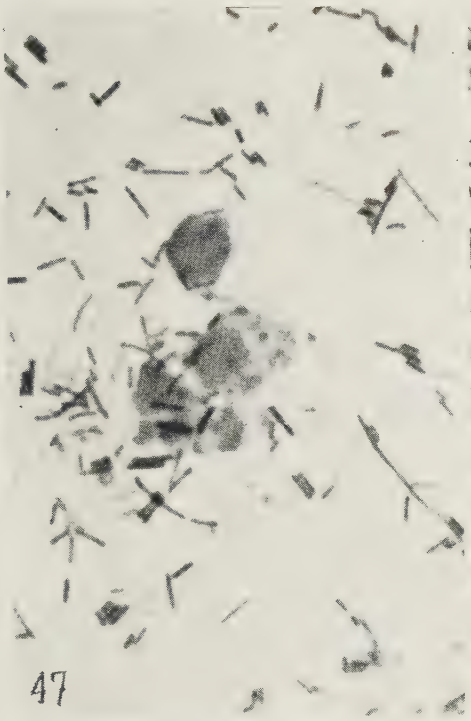


43

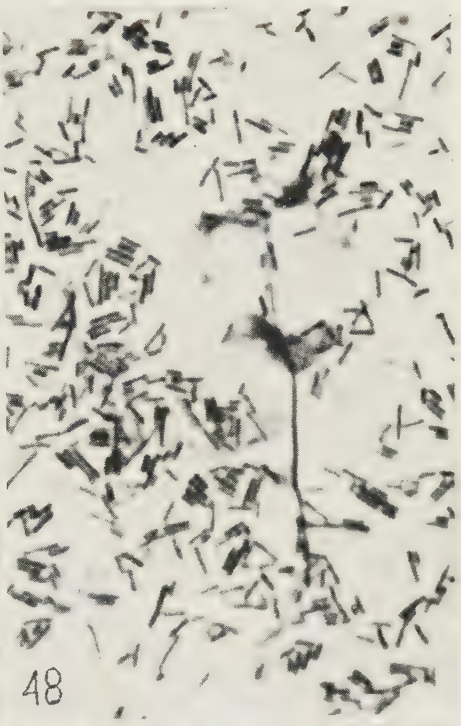
44


45

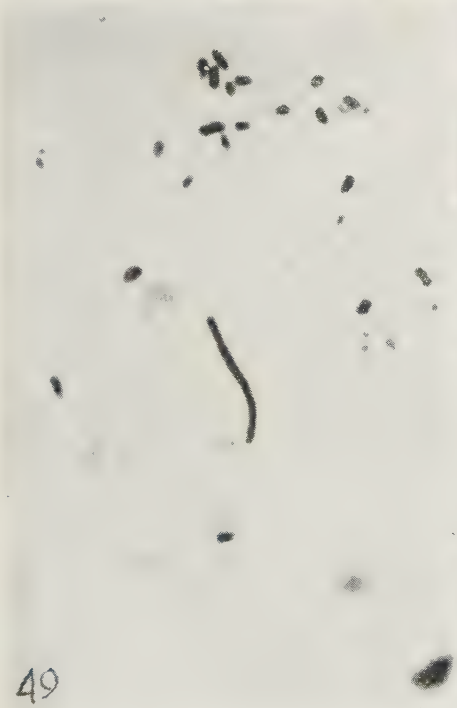

46



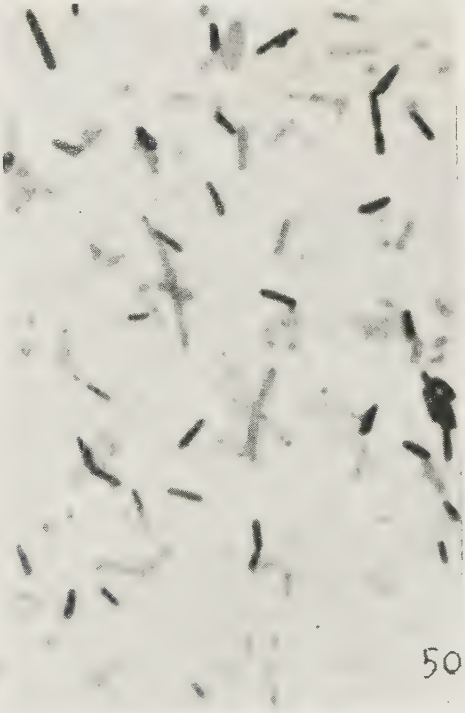
47



48

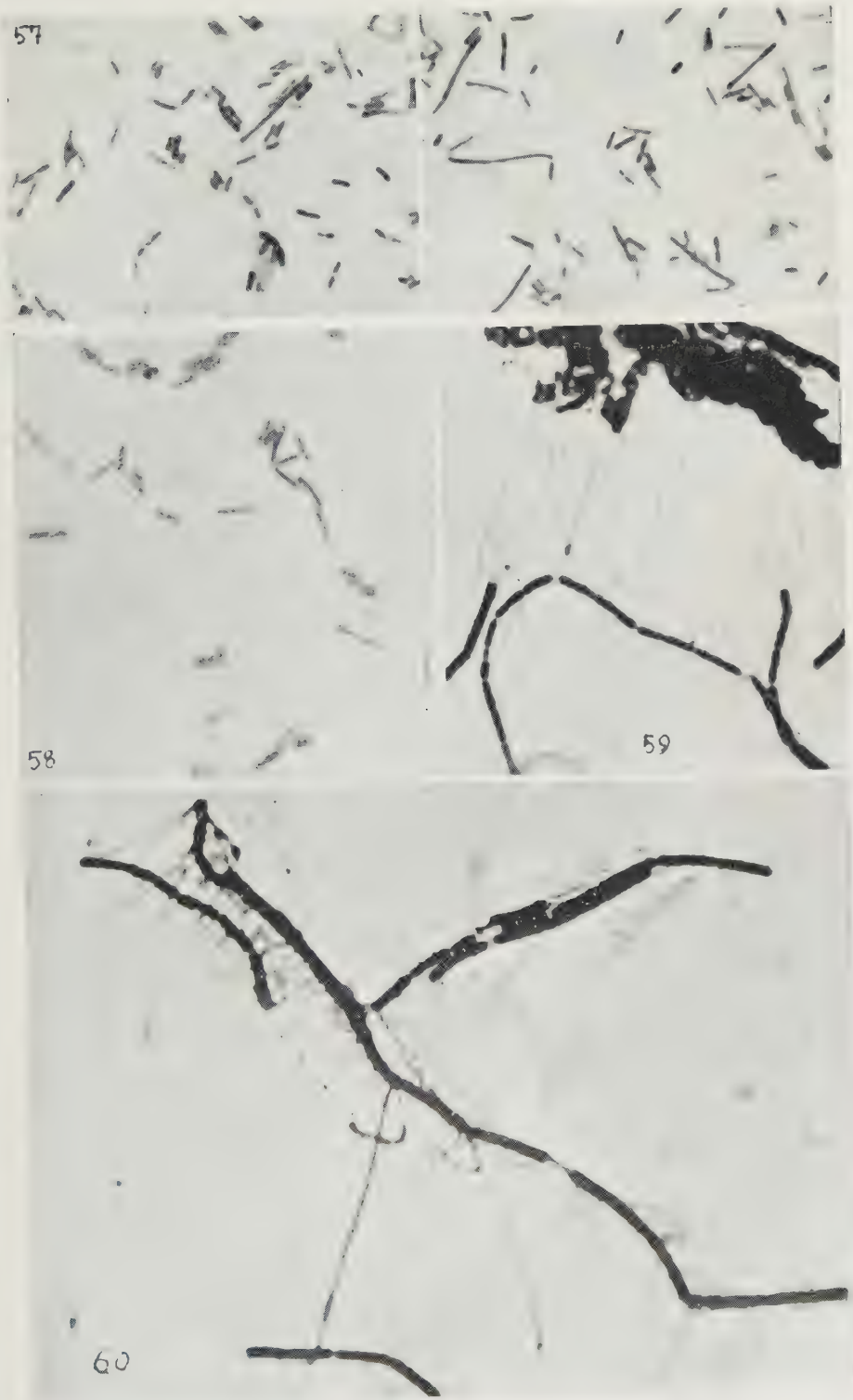


49



50

51
52
53
54
55
56

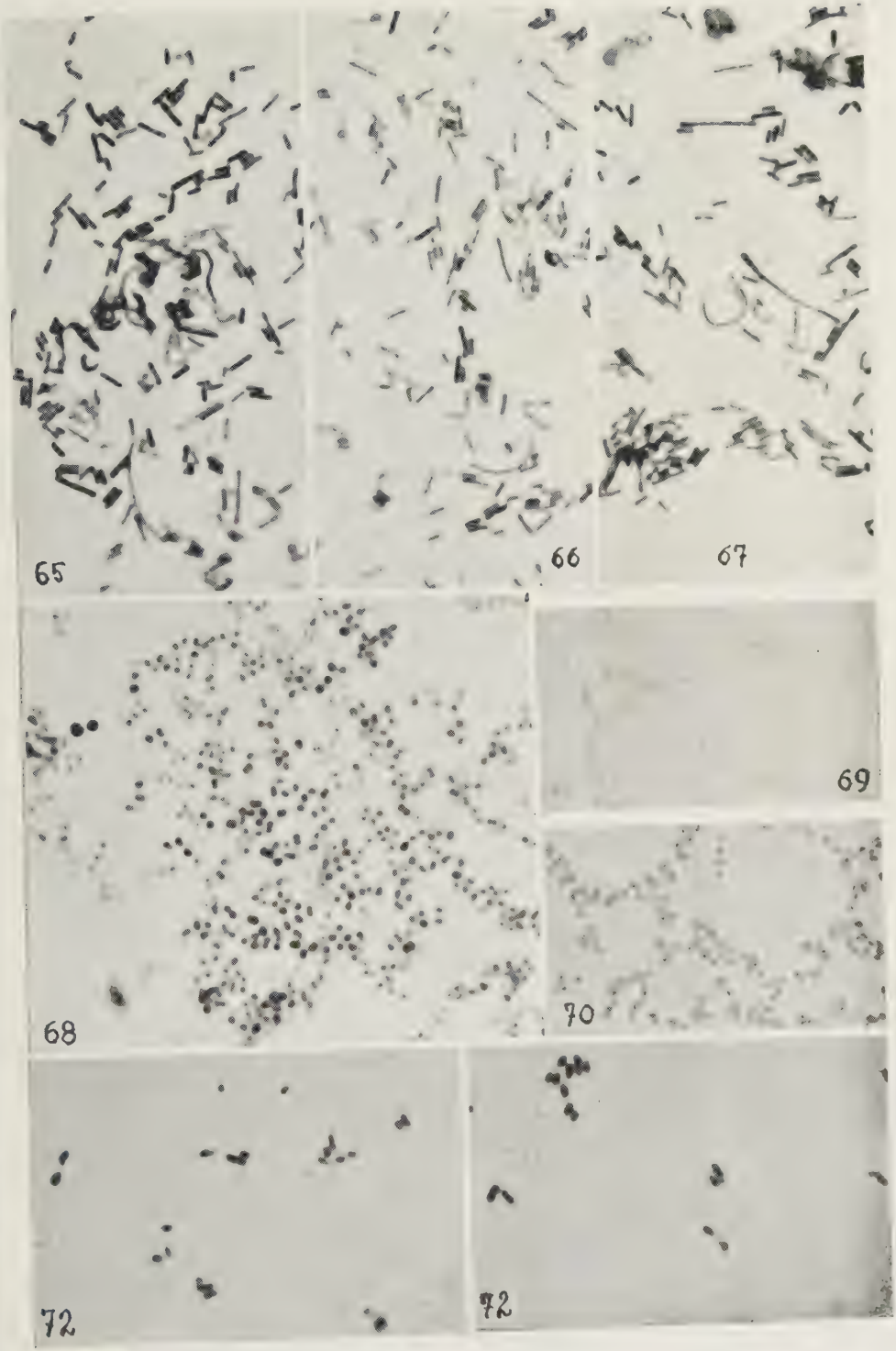

57
58
59
60

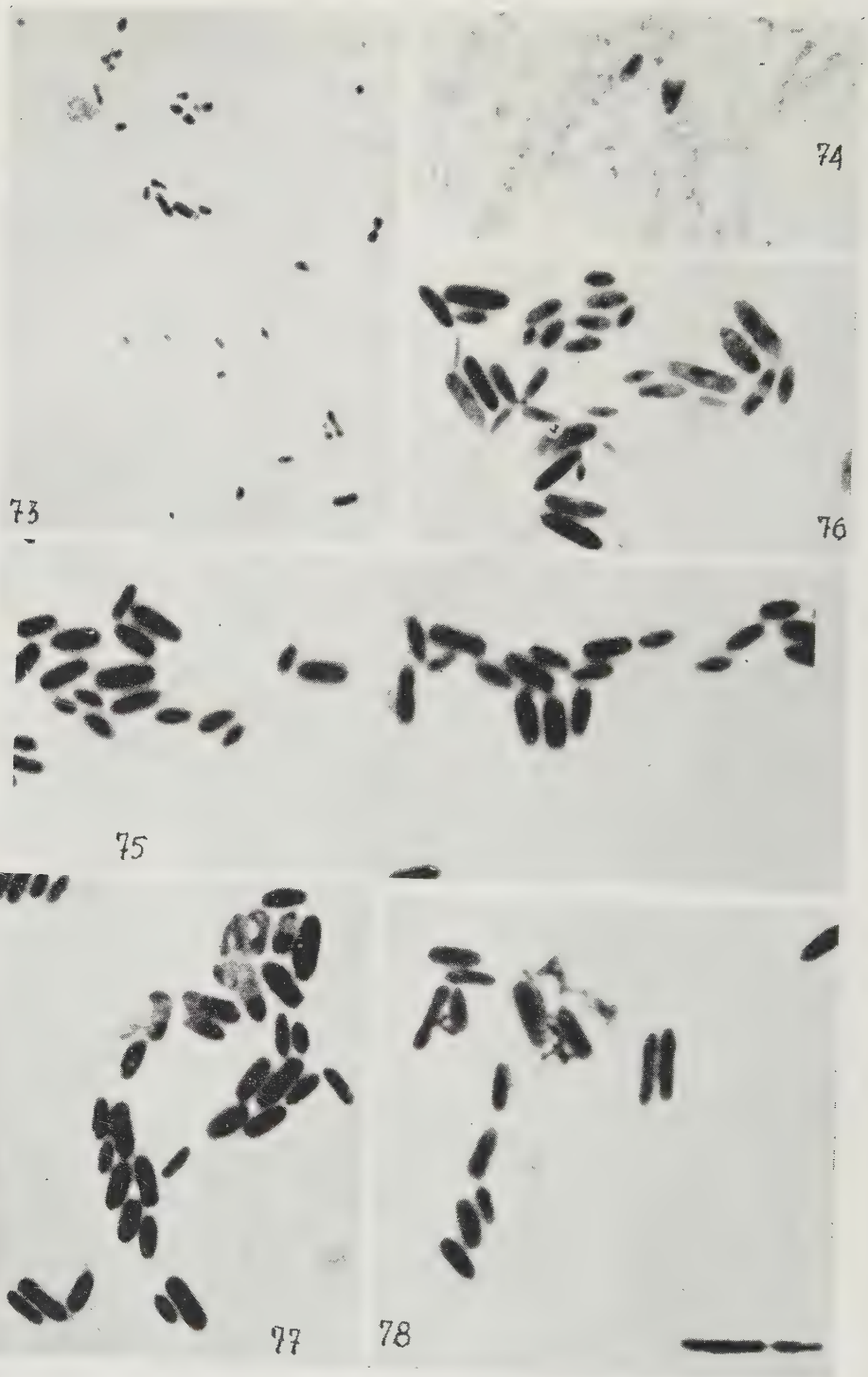
61

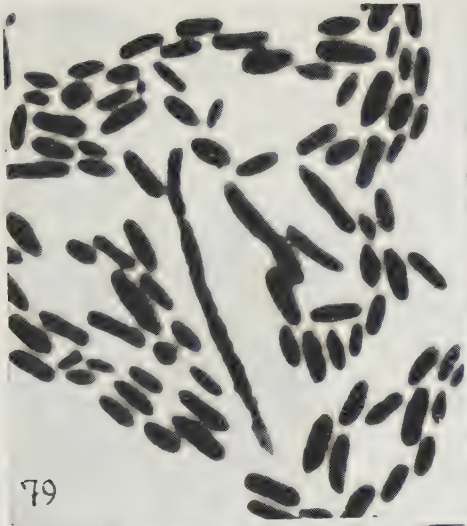
62

63

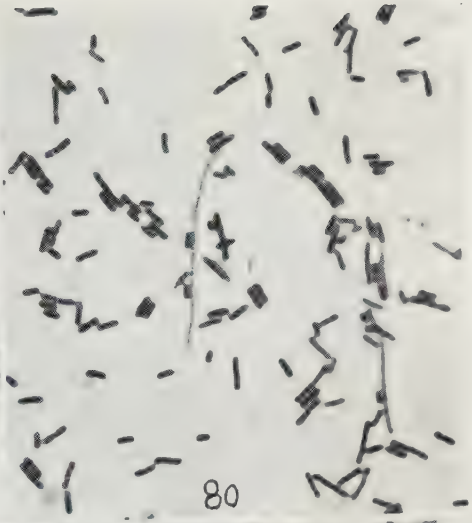
64


65
66
67
68
69
70
72
72


74
73
76
75
77
78



79



80

81

82

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN» DE MICROBIOLOGIA
SECCIONES DE MICOLOGIA Y DE QUIMICA

UNA NUEVA VARIEDAD DE *TORULOPSIS HOLMII* (JORGENSEN) Y ESTUDIO DE SUS PRODUCTOS METABOLICOS

POR

CARLOS RAMÍREZ GÓMEZ Y GONZALO SIERRA RICO

Durante unas investigaciones, realizadas por uno de nosotros, con el fin de aislar levaduras de alpechín, aislamos una variedad de *Torulopsis holmii*, con la propiedad singular de producir ácido en medios en los cuales entraban como fuentes de carbono, glucosa, galactosa o sacarosa, propiedad hasta ahora no señalada en esta especie.

Nos llamó la atención esta levadura al efectuar los auxanogramas, según el método de Beijerinck, modificado por Wickerham (1946). Dió como positivas las asimilaciones de la glucosa, galactosa y sacarosa, pero a las cuarenta y ocho horas la zona de asimilación de estos azúcares se volvía transparente, debido probablemente a la lisis de la levadura (fot. 1). Intentando interpretar este hecho, añadimos a las placas de Petri azul de bromofenol, dándonos en las zonas de asimilación una manifiesta reacción ácida.

DESCRIPCION

En extracto de malta: a los tres días, a 25° C., las células son casi redondas u ovales (2,5 — 4). (3,5 — 6) micras, aisladas o en cadenas cortas (figura 1). Sólo forma depósito. Se observa intensa fermentación.

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 19 de octubre de 1953.

En agar-malta: a los tres días, a 25° C., las células son ovales (4-5). (6-8) micras. Después de un mes a 17° C., la estría es de color crema parduzco, más claro en los bordes, lisa, pastosa, de borde casi liso.

Temperatura óptima: 22°-30° C.

Cultivo sobre porta: no produce seudomicelio, sobre agar-patata

Fermentación:

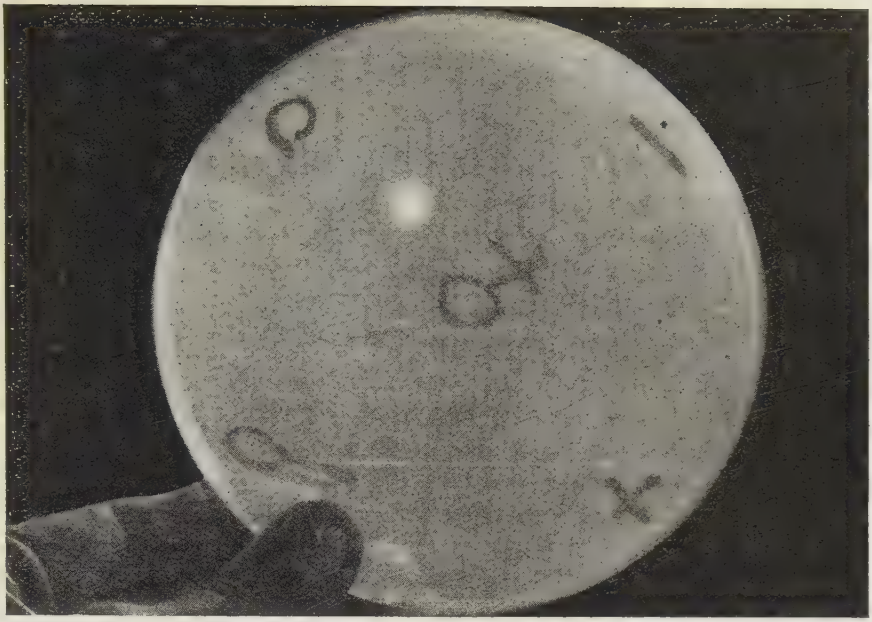
Glucosa	+
Galactosa	+
Sacarosa	+
Maltosa	—
Lactosa	—
Rafinosa	+ 1/3

Asimilación de fuentes de carbono:

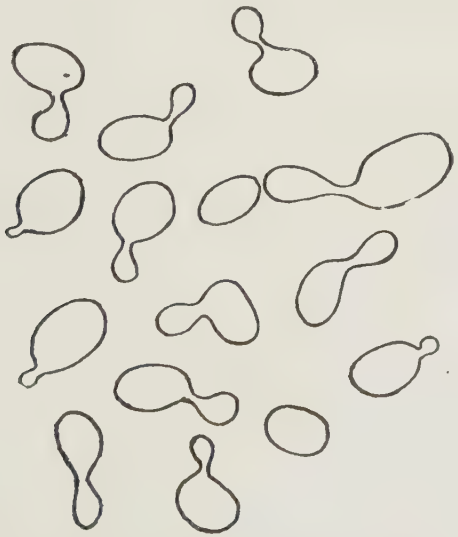
Glucosa	+	Glicerina	+	Inulina	—
Galactosa	+	Acido láctico	—		
Maltosa	—	Xilosa	—		
Sacarosa	+	Arabinosa	—		
Lactosa	—	Ramnosa	—		
Etanol	—	Sorbosa	—		
Manitol	—	Celobiosa	—		
Dulcitol	—	Rafinosa	+		

Asimilación de fuentes de nitrógeno:

Peptona	+
NO3K	—
Asparagina	+
Acido glutámico	+
Tirosina	+
Glicocola	+
Hidrolizado de caseína	+
Tartrato amónico	+
Urea	—
Sulfato amónico	+
Cloruro amónico	+
Acetamida	+



Fot. 1
Placa de auxanograma de fuentes de C. de *Torulopsis holmii*, var. acidi-lactici, nov. var. En los signos +, — y O, se observa un halo en la zona de desarrollo. Estos signos corresponden, respectivamente, a la glucosa, galactosa y sacarosa. Los otros dos signos corresponden a la maltosa y lactosa, que no son asimiladas.



Torulopsis holmii, var. *acidi-lactici*, nov. var. n.º 99. Células en malta a las 48 horas a 25º C (2.000 ×)

Esporulación: Negativa.

Hidrólisis de la arbutina: Ligeramente positiva a los seis días.

Este microorganismo se desarrolla bien en concentraciones de azúcares hasta del 35 por 100.

Por diferenciarse esta cepa del «tipo» en hidrolizar ligeramente la arbutina y producir ácido, es por lo que proponemos para esta levadura el nombre de *Torulopsis holmii, var. acidi-lactici,* pues las investigaciones que siguen demostraron ser láctico el ácido producido. Se conserva en la colección de nuestro Instituto con el número 99.

La acidez producida en el medio de crecimiento utilizado, inicia estas investigaciones tratando de conocer los productos metabólicos de demolición de los azúcares por *Torulopsis holmii var. acidi-lactici nov. var.*

METODOS

El microorganismo utilizado fué la levadura número 99 de nuestra colección, anteriormente descrita, aislada de los residuos de prensado de aceitiuna, recibidos de Sevilla. Para su determinación se siguió la clave de Lodder (1952).

Medio de cultivo.—El medio base de Wickerham (1946), de la siguiente composición:

$SO_4(NH_4)_2$	0,50 %
PO_4H_2K	0,10 »
$SO_4Mg.7H_20$	0,05 »
Glucosa	2,00 »
Agua, hasta	100 »

pH : 6,0

A una de las series se añadió agua de levadura al 1 : 1.000 para proporcionar vitaminas al medio y observar sus efectos.

Siembra.—Utilizamos cultivos jóvenes de cuarenta y ocho horas, rejuvenecidos en agar-malta a 25° C. para inocular, haciendo una suspensión con el medio base y repartiendo volúmenes iguales en tubos para mantener constante la relación superficie-volumen.

Se efectuaron también series, disminuyendo esta relación por aumen-

to del volumen, manteniendo la misma superficie, otras aumentando esta relación por aumento de superficie, efectuando la siembra en matraces de Erlenmeyer de 250 c. c. de capacidad. Otros matraces fueron aireados con aire estéril en el interior del medio de cultivo.

Todas estas series se incubaron a 25° C.

Los líquidos metabólicos fueron liberados de células, por filtración, para su análisis.

Acidez total.—10 c. c. de líquido metabólico fueron diluídos a 40 c. c. con agua destilada, llevados a ebullición para eliminar el CO_2, enfriando y valorando con NaOH, 0,1 N.

Acidez volátil.—Fué determinada por valoración del destilado en arrastre de vapor, con microaparato para operar sobre 10 c. c. de líquido metabólico, a los que se añadían otros 10 c. c. de agua destilada para lavar, calentando de tal forma, que en un principio no destile más que el líquido, hasta que su volumen haya quedado reducido a un tercio; manteniendo este volumen constante, se arrastra con vapor de agua hasta conseguir un destilado de 50 c. c., valorando la acidez con NaOH 0,1 N.

Cuerpos cetónicos.—Acido pirúvico. Fué investigado acorde a Rhotera (1948), con la variación de añadir amoníaco cuidadosamente para que queden dos capas, encontrándose en caso positivo para el pirúvico un anillo azul en la zona interferencial.

Acidos carboxílicos fijos.—Por cromatografía sobre papel, utilizando los disolventes *D* y *E*, según Jones, Dowling y Skraba (1953), y papel Watman número 1.

Acetaldehido.—Se investigó en la fracción «productos neutros volátiles», obtenida neutralizando 10 c. c. de líquido metabólico y recogiendo 5 c. c. de destilado sobre hielo. Sobre este destilado se formaron los derivados insolubles con la dimedona (5, 5 dimetil-cicloexano-1, 3 diona). Igualmente se investigó con la prueba de Barker y Summerson (1941).

Alcohol etílico.—Fué investigado en la fracción «productos neutros volátiles» por la formación de yodoformo, con yodo y KOH, observando las láminas cristalinas hexagonales amarillas típicas de este compuesto.

Glicerina.—Por el método de conversión de acroleína de Feigl y Frehdem (1937).

Acido láctico.—Empleamos el método de Barker y Summerson (1941), cuyo fundamento es la transformación en acefaldehido con ácido sulfúrico, y formación y desarrollo de la coloración violeta con p-hidroxidi-

fenilo. Calentando los tubos, e incluso los patrones, durante diez minutos en baño de agua hirviendo, con sulfúrico concentrado, y no cinco minutos, como dice el método, para eliminar el color que pudiera dar el ácido pirúvico. El acetaldehido, que también da color, fué eliminado neutralizando con NaOH el líquido metabólico y reduciendo a un tercio de su volumen por calentamiento. De este líquido, en este caso, a conveniente dilución, y corrientemente del líquido metabólico, se tomaron las muestras que fueron preparadas para la aplicación del método del modo siguiente: 0,2 c. c. de este líquido (filtrado) se diluye en tubo de ensayo a 4,5 c. c. con agua destilada y se añaden 0,5 c. c. de solución de SO_4Cu5H_2O al 20 por 100 y 0,5 gr. de Ca $(OH)_2$, dispersando por agitación. El precipitado de hidróxido de calcio-cobre aparta materiales que interfieren la reacción. Se redispersa varias veces durante media hora. Después de centrifugación durante diez minutos se transfieren 0,2 c. c. de líquido supernadante a un tubo limpio, cuidadosamente, para no arrastrar nada de precipitado, y en ellos se verifica la transformación a acetaldehido y formación y desarrollo del color acorde con el método.

La presencia de ácido láctico en líquidos metabólicos procedentes de demolición de los azúcares ha sido descrita en muchos Ficomicetos.

Raistrick (1938) encuentra ácido láctico en licores de fermentación en los géneros Rhizopus y Mucor. Los siguientes hongos producen ácido láctico: *R. arrhizus, R. chinensis, R. elegans, R. japonicus, R. nodosus, R. oryzae, R. pseudochinensis, Mucor rauxii, Monilia tamari* y *Blastocladia pringsheimii*. En algunos de ellos se ha estudiado su utilización industrial para obtención de ácido láctico, con algunas ventajas sobre la producción por bacterias, ya que, aunque el rendimiento es un poco más bajo, la operación de recuperación del ácido de los líquidos fermentados es bastante más sencilla.

Lockwood y colaboradores (1936, 1938) han estudiado muy detalladamente el empleo del Rhizopus oryzae para la producción de ácido láctico.

El mecanismo de la producción de ácido láctico en hongos ha sido discutido por Foster (1949).

El ácido láctico ha sido también encontrado como producto metabólico del *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación alcohólica.

Nosotros hemos encontrado trazas de ácido pirúvico, acetaldehido, etanol y pequeñas cantidades de ácido láctico en líquidos azucarados de cultivo de una variedad de *Torulopsis holmii*, dato este último no citado para esta especie hasta ahora.

En el presente trabajo comienza nuestra investigación sobre un medio muy sencillo, sintético, poco adecuado para una intensa producción de ácido láctico, para tratar de conocer los productos resultantes del metabolismo, y con ellos discutir su posible formación. A continuación ensayamos diversos medios semi-sintéticos de mayor complicación para estudiar las posibilidades industriales de esta levadura para la producción de ácido láctico, y sus factores y condiciones óptimas, ya que es conocido el caso de gérmenes que, produciendo sólo trazas de ácido láctico, han sido adaptados para la producción industrial de este ácido.

PARTE EXPERIMENTAL

Por análisis cromatográfico sobre papel se comprobó la existencia de un ácido fijo que, por su referencia, parecía corresponder al láctico; la existencia de este ácido fué corroborada por la técnica de Barker y Summerson (1941).

El siguiente cuadro nos muestra la producción de acidez por la levadura número 99 en el medio sintético basal (como media de dos valoraciones).

TABLA I

Días de incubación a 25° C.	Acidez total (*) cc. de NaOH 0,1 N por 100 cc.	Acidez volátil gr. por 100	Ac. láctico grs. por 100	Azúcar residual
2	7,2	0,0	0,065	—
5	8,7	0,0	0,078	—
9	10,2	0,0	0,092	—
12	15,4	0,0	0,137	consumido
16	15,5	0,0	0,137	—

Como se puede ver, el 0,137 por 100 de ácido láctico corresponde a 100 c. c. de medio; pero referido al tanto por ciento de ácido láctico por gramos de azúcar utilizados, resulta 6,8 por 100 de ácido láctico, cantidad muy pequeña.

En otra serie de experiencias y en las mismas condiciones, se añadió

(*) Corregido de la acidez del medio.

agua de levadura al medio basal, para observar el efecto de las vitaminas. No fueron observadas marcadas diferencias con la primera experiencia.

Vemos, pues, un aumento de acidez, máxima a los doce días, coincidiendo con el consumo total del azúcar. No se encuentran ácidos volátiles ni glicerina, pero sí trazas de ácido pirúvico, ácido láctico y etanol.

En otra serie aumentamos la relación superficie-volumen, manteniendo la misma superficie, pero disminuyendo el volumen (condiciones aerobias), obteniendo resultados mucho más bajos en la producción de láctico, como puede verse en el cuadro siguiente:

TABLA II

Días de incubación a 25° C.	Acidez total (*)	Acidez volátil	Acid. láctico grs. por 100	Azúcar residual
9	3,2	0,0	0,029	—
11	4,4	0,0	0,040	—
12	4,7	0,0	0,042	consumido
16	4,7	0,0	0,042	—

El 0,042 gr. de láctico por 100 c. c. de medio corresponde a 2,1 gr. de láctico por 100 gr. de azúcar empleado. Como se puede ver comparando las dos tablas (I y II), la cantidad de ácido láctico producida en el segundo caso baja más de 1/3 del primero.

Efecto de la aireación de los cultivos de T. holmii, var. acidi-lactici, nov. var. núm. 99, sobre la formación de ácido láctico.—Matraces de Erlenmeyer de 500 c. c. de capacidad, con 100 c. c. de medio sintético basal fueron inoculados con la levadura número 99. Unos matraces fueron tapados con algodón y otros con tapón de goma, equipado con tubos de entrada y salida (el de entrada sumergido en el medio), para aireación estéril en el interior del líquido. Se incubó durante doce días a 25° C. La producción de ácido láctico fué aproximadamente la mitad en el cultivo aireado que en el no aireado. En ninguno de ellos se encuentra acidez volátil. En el cultivo aireado se observa mayor desarrollo de levadura.

Pruebas de fermentación de la levadura número 99 a distintos pH.—Fueron sembrados diversos tubos de fermentación a pH de 1 a 9,5, observando que la fermentación óptima se produce entre pH 4,5 a 6. A pH 7 a 9,5 se observa formación de velo a los siete días.

(*) Corregido de la acidez del medio.

Pruebas de fermentación de medios semisintéticos.—Con el fin de poder conseguir una mayor producción de ácido, se probaron diversos medios semisintéticos, cuya composición damos a continuación:

Medio número 1

Glucosa...	50 gr.
PO_4HK_2	1 gr.
$SO_4Mg.7H_20$	0,5 gr.
SO_4Fe	0,01 gr.
ClK	0,5 gr.
$SO_4(NH_4)_2$	1,5 gr.
Extracto de malta (1)	100 c. c.
Agua corriente, hasta	1.000 c. c.

pH 7.

Este medio se esteriliza en corriente de vapor 1/4 de hora, tres días consecutivos. Se reparte en matraces de litro, añadiendo a cada matraz 20 gr. de CO_3Ca estéril, para mantener el pH constante. Los matraces se llenan con el medio hasta el cuello, para conseguir un mínimo de superficie aireada.

Se prepararon otra serie de matraces con el medio número 1, pero sin CO_3Ca. Se incubaron a 25° C., analizando una muestra de cada, todos los días.

En la tabla siguiente damos los resultados obtenidos.

TABLA III (Medio con CO_3Ca)

Días de incubación	pH	Glucosa residual	Glucosa consumida
1	6,0	4,1 gr. %	0,9 gr. %
2	5,0	4,07 gr. %	0,93 gr. %
3	5,0	2,85 gr. %	2,15 gr. %
4	5,0	2,84 gr. %	2,16 gr. %
5	5,0	2,76 gr. %	2,24 gr. %
6	5,0	2,65 gr. %	2,35 gr. %
7	5,0	2,57 gr. %	2,43 gr. %

(1) Según la receta de Lodder (1952).

TABLA IV (Medio n.º 1 sin CO_3Ca)

Días de incubación	pH	Glucosa residual	Glucosa consumida
1	5,0	4,58 gr. %	0,42 gr. %
2	4,0	3,08 gr. %	1,92 gr. %
3	3,0	1,85 gr. %	3,2 gr. %
4	3,0	1,70 gr. %	3,3 gr. %
8	3,0	1,70 gr. %	3,3 gr. %

De la observación de estas dos tablas pensamos que en el medio con CO_3Ca había algún factor que inhibía la fermentación del azúcar, deteniéndola antes que en el medio sin CO_3Ca. Pero como en el segundo caso, la fermentación del azúcar no es completa tampoco, intentamos averiguar qué otro factor, además del CO_3Ca, podría intervenir desfavorablemente en la fermentación. Se procedió del siguiente modo:

a) Suponiendo que el alcohol fuese dicho factor, se destiló el medio número 1, después de su primera fermentación, hasta eliminar el alcohol y productos volátiles de punto de ebullición inferior al del etanol. Se esterilizó y se volvió a inocular levadura número 99. Los resultados fueron los siguientes:

Medio destilado ..... { Con CO_3Ca, pH 7: no fermenta
Sin CO_3Ca, pH 7: no fermenta

Medio no destilado ..... { Con CO_3Ca, pH 7: no fermenta por 2.ª vez
Sin CO_3Ca, pH 7: no fermenta por 2.ª vez

b) Suponiendo que el CO_3Ca influye en la fermentación desfavorablemente, lo corroboramos por los datos de las tablas III y IV.

c) Suponiendo que el pH pueda influir, se tomaron muestras de medio fermentado a pH entre 7 y 3, no fermentando ninguna por segunda vez.

d) Por si el ácido láctico podía ser el factor que detiene la fermentación, tomamos medio número 1 recién hecho y le añadimos ácido

láctico, hasta lograr un pH 3,0, neutralizando a continuación con KOH. Después de sembrar levadura número 99, el medio fermentó normalmente.

De estas experiencias se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. El margen de pH tolerado en la fermentación es de 7 a 3.
2. La cantidad de azúcar asimilada es influenciada desfavorablemente por el CO_3Ca.
3. El factor que detiene la fermentación antes de agotarse el azúcar es distinto del alcohol producido, del ácido láctico o de sus sales formadas al neutralizar con KOH.

Medio número 2.—Idéntico al número 1, pero con 12 por 100 de glucosa en lugar de 5 por 100.

Los datos obtenidos con este medio vienen expresados en la tabla V.

TABLA V

Días de incubación	pH	Glucosa residual	Acidez total en cc. de NaOH 0,1 N en 10 cc. de medio	Glucosa consumida
1	5,0	11 gr. %	1,0	1 gr. %
2	4,0	7,4 gr. %	3,0	4,6 gr. %
3	3,0	4,5 gr. %	4,0	6,5 gr. %
4	3,0	4,5 gr. %	4,1	6,5 gr. %

Por esta tabla se ve que la fermentación había terminado a los tres días. Este medio fermentado fué neutralizado con KOH 0,1 N, resembrando en él levadura número 99 rejuvenecida e incubando a 25° C. No se produjo nueva fermentación, por lo que no se pudo aprovechar el 4,5 por 100 de azúcar residual.

Medio número 3

Glucosa	100 gr.
$SO_4Mg.7H_20$	0,5 gr.
SO_4Fe	0,01 gr.
$SO_4(NH_4)_2$	1,0 gr.
Malta	100 c. c.
Agua	400 c. c.
Solución tampón de fosfato de pH 7	500 c. c.

Esta solución tampón consiste en una mezcla de dos soluciones A y B en las proporciones de 585 c. c. de la solución A por 915 c. c. de la solución. B.

Solución A: 9,078 gr. de PO_4H_2K y agua destilada hasta completar 1.000 c. c.

Solución B: 11,876 gr. de PO_4NHa_2 y agua destilada hasta 1.000 c. c.

Este medio contiene, por lo tanto, 1,086 por 100 de PO_4HNa_2 y 0,531 por 100 de PO_4H_2K. El pH del medio es de 6,5, y el azúcar total es de 11,5 por 100.

Medio número 4

Glucosa	100 gr.
$SO_4Mg.7H_2O$	0,5 gr.
SO_4Fe	0,01 gr.
$SO_4(NH_4)_2$	1,0 gr.
Malta	100 c. c.
Soiuclón tampón fosfato de pH 7	100 c. c.
Solución tampón acetato de pH 4,62	250 c. c.
Agua	400 c. c.

La solución tampón de acetato consiste en la mezcla siguiente:

NaOH normal	50 c. c.
Acido acético normal	100 c. c.
Agua destilada	350 c. c.

El pH del medio es 4,5, y el azúcar total es de 11,5 por 100.

Medio número 5

Glucosa	100 gr.
$SO_4Mg.7H_2O$	0,5 gr.
SO_4Fe	0,01 gr.
$SO_4(NH_4)_2$	1,0 gr.
ClK	0,5 gr.
Malta	100 c. c.
Agua	900 c. c.
Oxido de cinc	3 gr.

El pH del medio es 7,0, y el de azúcar total es de 11,5 por 100.

Empleamos estos medios por si se podía lograr un mayor consumo de azúcar por la levadura número 99.

En la tabla siguiente damos los resultados obtenidos con estos tres medios:

TABLA VI

Medio N.º	Días de incubación	pH final	Azúcar consumida
3	8	5,0	5,2 gr. %
4	10	4,0	6,0 gr. %
5	10	5,0	5,5 gr. %

Como se ve, pocas diferencias importantes se encuentran en el comportamiento de estos tres medios.

Se ensayaron otros medios semisintéticos, variando unas veces las fuentes de carbono y otras las de nitrógeno, no lográndose mayores rendimientos del inicial. Las fuentes de carbono empleadas fueron: la galactosa, la sacarosa, la glicerina.

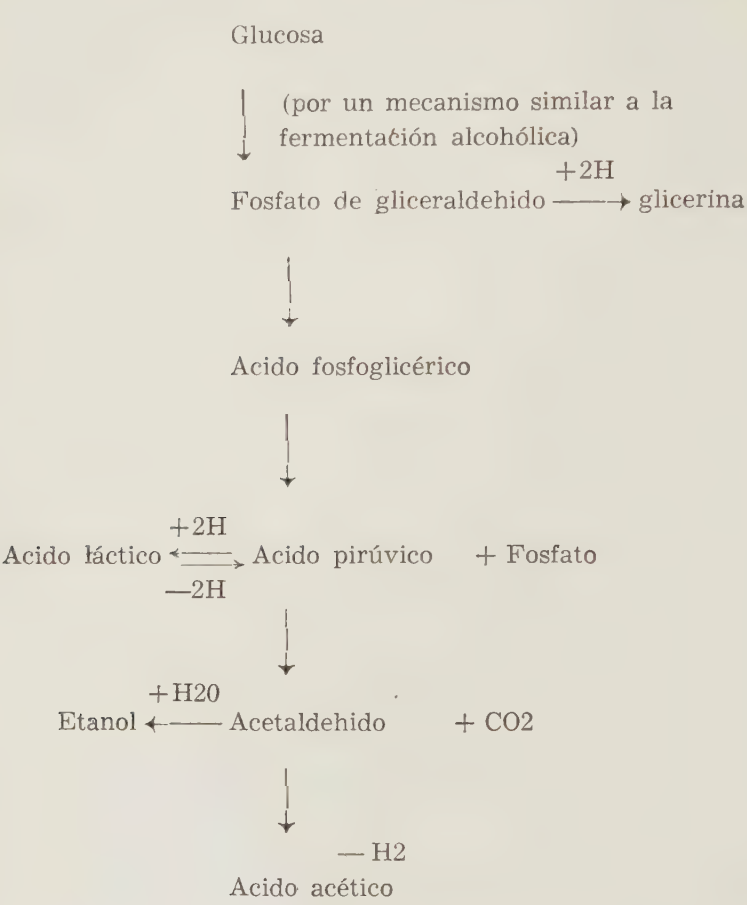
Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron: Tartrato amónico, asparagina, ácido glutámico, tirosina, glicocola, hidrolizado de caseína.

En todos los casos se halló una producción de ácido láctico aproximada al 6 por 100 del azúcar consumida, lo que no nos permite abrigar grandes esperanzas sobre su utilización bajo un punto de vista industrial.

Guiados por los productos finales encontrados en la fermentación de la levadura número 99; ácido láctico, etanol y CO_2, coincidiendo con los encontrados por Foster (1949) en condiciones anaerobias para hongos productores de ácido láctico, creemos muy probable se trate de una fermentación análoga a la discutida por Foster.

Nuestra levadura se diferencia en su fermentación de los azúcares, de la fermentación de las bacterias lácticas heterofermentativas (en las cuales Nelson y Workman (1935, 1936, 1940) han dado recientes puntos de vista), en que en éstas se encuentra el ácido láctico acompañado de ácido acético y glicerina, además de etanol y CO_2.

Se puede interpretar, pues, por el siguiente esquema:



La fermentación de *Torulopsis holmii*, var. *acidi-lactici* nov. var., se caracteriza por la ausencia, en todo momento, de ácido acético. El paso acetaldehido —→ ácido acético representa una oxidación, que no es favorecida en la fermentación de esta levadura. Sin embargo, es favorecido el paso ácido pirúvico —→ láctico, que representa una reducción.

Waksman y Foster (1939) encuentran que la cantidad de ácido láctico producido por mohos se incrementa bajo condiciones aerobias.

En el caso de la levadura estudiada por nosotros, obtenemos efectos contrarios.

Expresamos nuestro agradecimiento a los doctores R. Lahoz y M. Riaño por su colaboración en la extracción del ácido láctico de los medios de metabolismo, y al señor Alemany Soto por su colaboración en las determinaciones cromatográficas efectuadas en este trabajo.

RESUMEN

Se ha aislado una nueva variedad de *Torulopsis holmii*, en la que, entre otros productos de metabolismo, se encuentra el ácido láctico, propiedad hasta ahora no señalada en esta especie.

La aireación de los cultivos de dicha levadura disminuye la producción de ácido láctico a la mitad, comparada con los cultivos no aireados en las mismas condiciones.

La cantidad de ácido producida viene a ser un 6,5 por 100 del azúcar consumida, no siendo, por lo tanto, de aplicación industrial.

RÉSUMÉ

Il a été isolé une nouvelle variété de *Torulopsis holmii*, ayant la propriété singulière de produire de l'acide lactique, propriété non signalée, jusqu'ici parmi les différentes souches isolées de cette espèce.

Les cultures aérées produisent la moitié d'acide lactique que les cultures non aérées, dans les mêmes conditions.

Les quantités d'acide produite par cette levures sont généralement 6,5 % du sucre assimilé, rendement trop bas au point de vue industriel.

SUMMARY

A new variety of *Torulopsis holmii* has been studied, which has the propertie to produce lactic acid, with other metabolic products. This propartie was not yet mentioned for any strain of *Torulopsis holmii*.

With aerated cultures, the amount of lactic acid decrease about a half, when they are compared with no aerated cultures in the same conditions.

BIBLIOGRAFIA

BARKER, J. B. and W. H. SUMMERSON, J. Biol. Chem., 138: 535, 1941.
FEIGL, F. and O. FRENDEM: Mikrochim. Acta., 1: 137, 1937.
FOSTER, J. W. Chemical activities of Fungi, Academic Press, Inc. N. Y., 1949.
JONES, A. R., E. J. DOWLING and W. J. SKRABA. Ann. Chem. March. 394, 1953.
KING, E. J. Microanálisis bioquímicos en medicina. Ed. Científico Médica, pág. 103, 1948, Barcelona.
LOCKWOOD, L. B., G. E. WARD and O. E. MAY, J. Arg. Res., 53: 849, 1936.
LODDER, J. and N. J. W. KREGER VAN RIJ. The Yeasts, North Holland Publishing Company. Amsterdam, 1952.
NELSON, M. E. and. C. H. WERKMAN. J. Bact. 30: 457, 1936.
NELSON, M. E. and C. H. WERKMAN. J. Bact. 31: 603, 1936.
NELSON, M. E. and C. H. WERKMAN. Iowa State College J. Sci. 14: 359, 1940.
RAISTRICK, R. H. Ergeb. Enzymforsch. 7: 316, 1938.
WAKSMANN, S. A. and J. W. FOSTER. Journ. Agr. Res. 57: 873, 1936.
WARD, G. E., L. B. LOCKWOOD, O. E. MAY and H. T. HERRICK. J. Am. Chem. Soc. 58: 1286, 1936.
WARD, G. E., L. B. LOCKWOOD, B. TEBENKIN and P. A. WELLS. Ind. Eng. Chem. 30: 1233, 1938.
WICKERHAM, L. J. Bact. 52: 283, 1946.
YOE, J. H. and L. C. REID. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 13: 137, 1937.

C. S. I. C.
INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID

ESTUDIO DEL CORN STEEP Y DE SU INFLUENCIA EN LA FERMENTACION ALCOHOLICA

POR

MARÍA APARICIO

La lectura de los trabajos sobre la influencia del *corn steep* en la producción de la penicilina, nos sugirió la idea de ver si esta sustancia tenía algún efecto sobre la fermentación alcohólica, a la vez que comprobamos esto, nos propusimos encontrar la parte del *corn steep* que ejercía esta acción.

ANTECEDENTES HISTORICOS

El *corn steep* es un subproducto de la industria del almidón, y, por lo tanto, tan antiguo como esta industria; pero su importancia no la alcanzó hasta que Moyer y Coghill (18, 21) comunicaron en 1946 que la adición del *corn steep liquor* al medio modificado de Czapk-Dox estimulaba grandemente la biosíntesis de la penicilina por los microorganismos del grupo *Penicillium-notatum-crisogenum*.

Ya Behr (1) en 1909 sugirió que el *corn steep liquor* podía emplearse como medio nutritivo para los microorganismos. Desde entonces se ha venido utilizando con carácter más o menos industrial, sobre todo para la preparación de levaduras, y así aparece incluído en las patentes de Wagner (26, 27 y 28). Leeg y Cristensen (13) lo incluyen en una patente para la obtención del butanol y acetona por bacterias; File (8), en otra,

para la producción de bebidas; Pollack (22), en la suya, sobre productos para mejorar el pan; Walsch y colaboradores (29), en otra, para la preparación de cervezas; Wells y colaboradores (30) lo utilizan para la obtención del ácido cetoglucónico de la fermentación de la glucosa. Moyer y Coghill (19, 20) lo habían utilizado, antes de hacerlo con vista a la producción de la penicilina, para la obtención del ácido glucónico e itacónico, respectivamente; Lockwood (15, 16) lo utilizó también para la obtención de este ácido.

Como se ha dicho antes, el *corn steep* es un subproducto de la industria del almidón, y, por tanto, su preparación va unida a la de éste. La tecnología de este producto está discutida con detalle por Kerr (10). Existe una descripción divulgadora publicada por la Corn Industries Research Foundation (6), y para los problemas relativos a las aguas residuales se puede consultar a Greenfield, Cornell y Hatfield (9). Por último, una recopilación de todo el proceso es dada por Ligget y Koffler (14).

A raíz del empleo del *corn steep* en la producción de la penicilina, surgen varios trabajos sobre la composición de éste, en los cuales se trata de explicar la acción estimuladora del *corn steep*. Así, están los de Cardinal y Hedrick (4), que estudian los compuestos nitrogenados del *corn steep*. Los de Tanner, Pfeiffer y Van Lanen (24), que analizaron también el *corn steep* y encontraron algunos factores de crecimiento. Los de Koffler, Knight y Frazier (11, 12), que se concretaron a la parte mineral del *corn steep* y determinaron varios elementos por análisis espectral. Moyer y Coghill (18, 21) trataron también de explicar el mecanismo por el cual se estimula la producción de la penicilina cuando se le agrega al medio de cultivo *corn steep*. Por último, White, Kramptzy y Werkman (31) estudian también la acción de los aminoácidos del *corn steep* sobre la producción de penicilina.

PARTE EXPERIMENTAL

Material y métodos

Preparación del mosto.—Las experiencias se iniciaron con mosto concentrado del comercio, y como no se conseguían datos concordantes, probablemente debido a las sustancias agregadas como antisépticos, se procedió a preparar un mosto por nosotros mismos, que tuviera una composición homogénea y no contuviera conservador alguno.

Para ello se compró uva moscatel en cantidad suficiente que bastara a todo el trabajo. La uva se desrraspó y se trituró en un Turmix; después se filtró varias veces, primero a través de un lienzo y después por papel de filtro corriente, hasta conseguir un líquido claro; se mezcló bien todo el líquido y se llenaron botellas con cierre automático, se esterilizó en autoclave en corriente de vapor durante una hora, tres días consecutivos.

Con las operaciones antedichas obtuvimos un mosto tal vez no de composición análoga al mosto corriente, pero sí de composición homogénea para poder comparar los resultados obtenidos.

El mosto así obtenido se conservó en la nevera, en buenas condiciones, a unos 4° C. durante todo el tiempo que duró el trabajo, ya que no ocurrió ninguna fermentación espontánea.

Corn steep utilizado.—El rendimiento obtenido en la preparación del *corn steep* en nuestro laboratorio era muy pequeño y la desecación muy engorrosa, por lo que se decidió emplear el *corn steep* que nos suministraron de la fábrica de penicilina de la Empresa «Antibióticos, S. A.», de procedencia francesa.

FIG. 1

La preparación que nosotros utilizamos fué la aconsejada por Bowden y Peterson (3).

Método empleado para seguir el curso de la fermentación.—Hemos utilizado el aparato de la figura 1, variación del empleado por Meis-

sel (17). En el matracito A se pone el mosto para fermentar. En la ampolla superior B se pone ácido sulfúrico concentrado para que el anhídrido carbónico, al pasar por el ácido, deje el agua arrastrada. Por pesada diaria se determina el CO_2 desprendido en veinticuatro horas; de estas pesadas se han representado gráficamente CO_2 en función del tiempo (días).

Levaduras empleadas.—Se emplearon dos estirpes del género Saccharomyces, procedentes del Instituto Cajal, designadas con los números 106 y 107.

También se utilizó otra levadura del género Saccharomyces cerevisiae, procedente de Holanda.

Análisis cromatográfico

Método empleado

Se ha realizado la cromatografía en sentido descendente y monodimensional, con fenol como disolvente, según «Paper Cromatography» de Richard J. Block (2).

Preparación del papel.—Se empleó papel Whatman número 1 para cromatografía, en pliegos de 20 por 35 cm. A unos 5 cm. del borde se hizo una raya, y de tres en tres centímetros se marcó un punto, donde se pusieron las sustancias a cromatografiar. Los papeles se lavaron con solución tampón de pH 12 y 8,4 de composición:

pH 12 50 c. c. de PO_4HNa_2 0,067 M + 50 c. c. de NaOH 0,067 M

pH 8,4 50 c. c. de ac. bórico y ClK 0,067 M + 8,50 c. c. de NaOH 0,067 M

Se secaron a la temperatura ambiente.

Disolvente.—Solución acuosa de fenol. El fenol se destiló previamente para purificarlo. Se preparó una solución al 75 por 100 de fenol en agua bidestilada, se puso en frasco topacio y se conservó en la nevera (Drape y Pollard) (7). Se prepararon una serie de soluciones standard de aminoácidos 8 mM. en alcohol isopropílico al 10 por 100, de ácido aspártico, glutámico, serina, glicina, treonina y alanina, prolina, leucina e isoleucina.

Cámara cromatográfica.—Se utilizó como cámara cromatográfica un tanque de cristal de dimensiones 43 × 30 × 35 cm., cerrado con una placa de vidrio gruesa, y para que el cierre fuera perfecto, se puso en los bordes del tanque plasticina.

Como cubetas se emplearon primero unas navecillas de polivinilo, pero como se obtenían unos cromatogramas muy sucios, se sustituyeron por otras de vidrio neutro.

Las condiciones en que se desarrollaron los cromatogramas fueron: la temperatura del ambiente, unos 20° C.; en atmósfera saturada de vapor de fenol acuoso, para lo que se puso en el fondo de la cámara un vasito con solución de fenol. También se introdujo otro vasito con NH_3 0,3 % (Cosden Gordon y Martín) (5) veinticuatro horas antes de introducir los cromatogramas.

Hidrólisis del problema.—El *corn steep* fué primeramente dializado a través de colodión, para quitar las sales inorgánicas. 50 mgr. se pusieron en un matracito de 50 c. c., con 10 c. c. de ClH 6N, hirviéndose a reflujo durante dieciocho horas, a unos 100° C. El ClH se eliminó por evaporación al vacío, después de agregarle varias veces agua y desecarlo en baño maría; se disolvió en agua caliente, se filtró y se evaporó de nuevo; por último, se disolvió la película que quedó en alcohol isopropílico al 10 por 100 y se ajustó el pH a 6 con NaOH N/1.

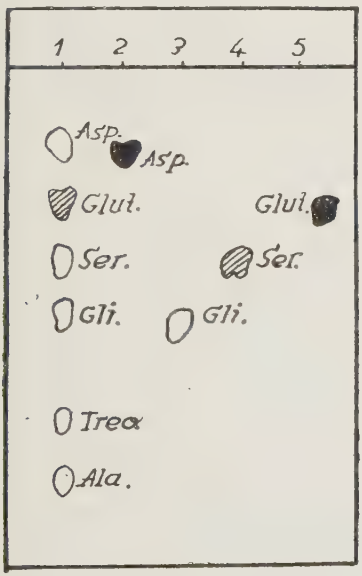


FIG. 2

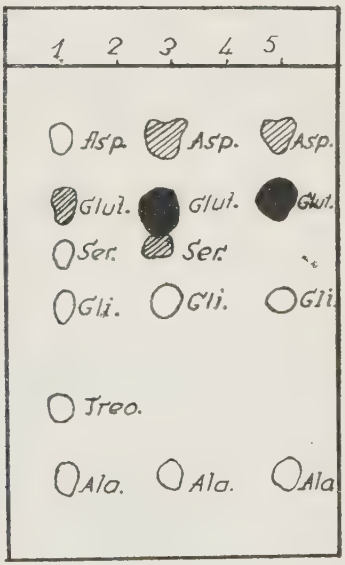


FIG. 3

Cromatogramas monodimensionales desarrollados con fenol. Posición, 1, problema; 2, 3, 4 y 5, aminoácidos standard.

Preparación del cromatograma.—Con una micropipeta se ponen en los puntos de la raya del papel: en el número 1, una gota del problema, y en los otros, las soluciones standard de aminoácidos. Se neutralizan con vapores de NH3. Se introducen en la cámara y se dejan desarrollar durante veinticuatro horas.

Se sacan y se secan en una vitrina a unos 50° C. durante tres horas, para eliminar el fenol. Se lavan con éter etílico y se dejan secar a la temperatura ambiente toda la noche.

Revelado.—Se pulverizan los papeles con solución de ninhidrina 0,2 por 100 en acetona conteniendo unas gotas de ácido acético (Consden y Gordon (5). Se secan en estufa abierta a 60° C.

Aálisis del corn steep.

Primeramente realizamos el análisis con una solución de *corn steep* en ClH 6N; después, neutralizado con NaOH N, sin realizar hidrólisis

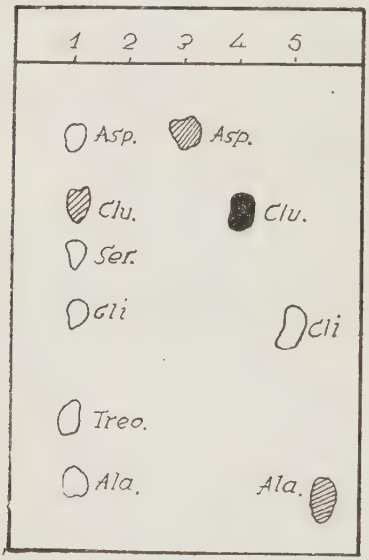


FIG. 4

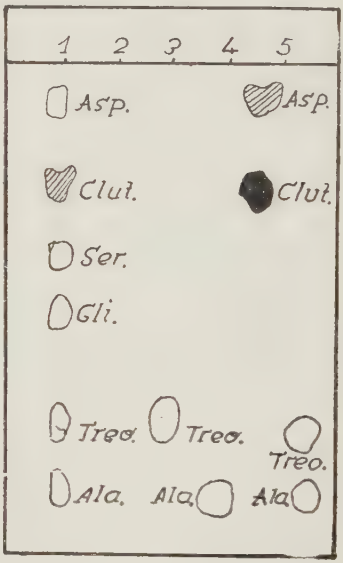


FIG. 5

Cromatogramas monodimensionales, desarrollados con fenol. Posición 1 problemas; 2, 3, 4 y 5, aminoácidos standard.

aminoácidos libres. El desarrollo de este cromatograma se hizo con fenol por calentamiento, para investigar si en el *corn steep* se encontraban

como disolvente, y no apareció mancha alguna en la posición correspondiente al problema, pero sí en los aminoácidos standard, de lo que se deduce no existen aminoácidos libres.

Después se repitieron las pruebas con el *corn steep* dializado e hidrolizado con ClH 6N, calentando bajo reflujo a unos 100° C. durante dieciocho horas. Con fenol como disolvente se obtuvieron seis manchas en la posición del problema, como puede verse en las figuras 2, 3, 4 y 5, que fueron identificadas como ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, treonina y alanina (figs. 2, 3, 4 y 5). Con el disolvente alcohol bencílico-butanol, no conseguimos hacer ninguna separación; sólo aparecía una mancha que se coloreaba con la ninhidrina, casi en la misma posición donde se ponía la gota del problema, que probablemente son los ácidos aspártico y glutámico.

Experiencias realizadas

I. *Comprobación de la acción del* corn steep *sobre la fermentación alcohólica*

Se emplearon las estirpes 106, 107 y *Saccharomyces cereviseae.*

Se preparó mosto con *corn steep* en concentraciones de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,5 y 2 por 100.

Se ajustó el pH a 5,5 con NaOH N/1 y se esterilizó en corriente de vapor.

En los matracitos anteriormente descritos se pusieron 50 c. c. de las soluciones preparadas, y se esterilizó de nuevo; después, en la ampolla superior de los matraces se puso, con pipeta Pasteur estéril, el ácido sulfúrico concentrado.

Se preparó en agua estéril una suspensión de cada estirpe, las que anteriormente se habían cultivado en medio Sabureau. Se inoculó cada matraz agregándole dos gotas de estas suspensiones con pipeta Pasteur estéril.

Los ensayos se llevaron por quintuplicado, y para cada estirpe se acompañó de una prueba testigo.

Se taparon los matracitos, y se cultivaron en estufa a 30° C. durante una semana. Diariamente se determinó el anhídrido carbónico desprendido por pesada.

En la tabla número 1 aparecen los valores medios (obtenidos de los cinco ensayos) del anhídrido carbónico, expresados en gramos, desprendido diariamente, para la estirpe 107 en los 50 c. c. de mosto.

No se incluyen las correspondientes a las estirpes 106 y Saccharomyces por ser análogas a ésta.

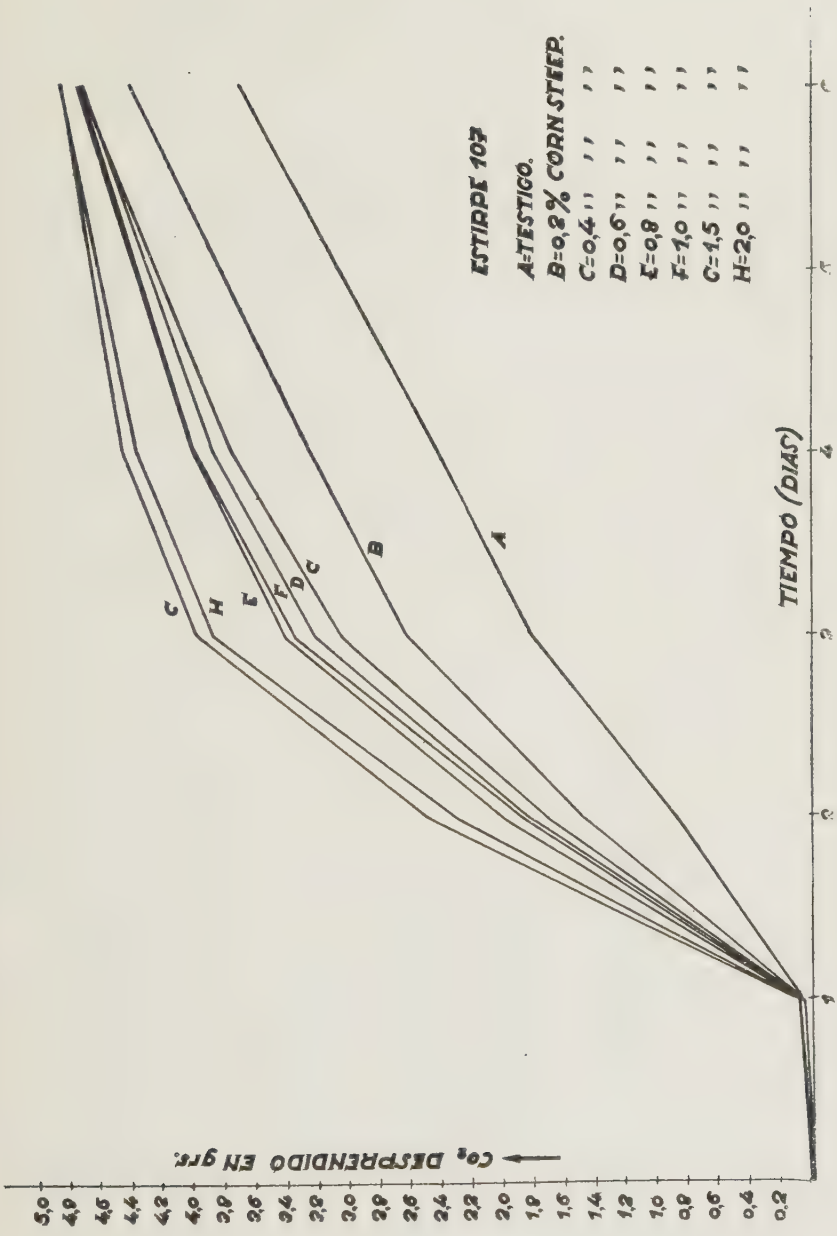
TABLA N.º 1

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON CORN STEEP; CON LA ESTIRPE 107

Contenido en corn steep	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
0,2 %	0,0529	1,4953	2,6280	3,2559	———	4,4184
0,4 %	0,0549	1,7056	3,0569	3,7632	———	4,7204
0,6 %	0,0617	1,8149	3,2129	3,8725	———	4,7064
0,8 %	0,0680	1,9999	3,4178	4,0293	———	4,7327
1,0 %	0,0528	1,8645	3,3624	4,0197	———	4,7578
1,5 %	0,0937	2,4912	3,9875	4,4618	———	4,8504
2,0 %	0,0780	2,3080	3,8805	4,3813	———	4,8348
Testigo	0,0358	0,8805	1,8183	2,4288	———	3,7162

Estos valores medios del CO_2 desprendido se han representado gráficamente en función del tiempo (días) en la gráfica número 1. La curva A es el testigo, y desde la B a la H corresponden al mosto, con las adiciones de *corn steep* de 0,2 a 2 por 100. El CO_2 desprendido, que aquí los tomamos como medida aproximada del azúcar fermentado, es muy superior en el mosto con *corn steep* que en el testigo, sobre todo entre los días dos al cinco. Consideremos como ejemplo los valores correspondientes al día tres, para los dos límites:

CO_2 desprendido por el testigo 1,8
CO_2 desprendido por el mosto con 0,2 % de *corn steep* ... 2,6
CO_2 desprendido por el mosto con 2 % de *corn steep* 3,87



Gráfica 1
Fermentación de mosto solo, y de mosto con *corn steep*.

La misma cantidad de levadura ha fermentado en los 50 c. c. de mosto cuando se le agregó 0,2 por 100 de *corn steep*, casi la mitad más que el testigo, y con el 2 por 100 más del doble.

II. *Acción de las cenizas sobre la fermentación*

El *corn steep* se incineró en crisol de platino al rojo, obteniéndose un 14 por 100 de cenizas.

Se preparó mosto con cenizas de *corn steep* en proporciones análogas a las contenidas en éste a las concentraciones de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1, 1,5 y 2 por 100. Se ajustó el pH a 5,5 con NaOH N/1 y se realizó todo como en la experiencia anterior, si bien con una sola estirpe (la 107), y para simplificar sólo se hizo por triplicado.

También se acompañó de un testigo.

En la tabla número 2 vienen expresados los valores medios del anhídrido carbónico desprendidos por día. Como puede observarse, no hay variación entre los valores correspondientes al testigo y al mosto con las cenizas del *corn steep*, por lo que creemos innecesario insertar la gráfica correspondiente.

TABLA N.º 2

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON CENIZAS DE CORN STEEP; CON LA ESTIRPE 107

Contenido de cenizas del corn steep	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
0,028 %	0,0264	0,8420	1,6067	———	3,0906	3,5926
0,056 %	0,0206	0,7944	1,5910	———	3,0807	3,5897
0,084 %	0,0191	0,7558	1,5713	———	3,1037	3,6353
0,112 %	0,0169	0,8002	1,5747	———	3,0649	3,5556
0,140 %	0,0151	0,7438	1,4558	———	2,9256	3,4573
0,210 %	0,0180	0,7827	1,6099	———	3,1709	3,7490
0,280 %	0,0156	0,7362	1,5147	———	2,8220	3,6077
Testigo	0,0265	0,8567	1,6237	———	3,0888	3,5789

III. *Ensayo sobre la parte soluble e insoluble del* corn steep *en el mosto.*

La solubilidad del *corn steep* en el mosto es pequeñísima; ni aun en la porporción más baja (0,2 por 100) se consigue solubilizarlo, sino que queda en el fondo en forma de precipitado.

Se filtró, una vez preparado el mosto con el *corn steep,* por filtro de papel corriente; se esterilizó de nuevo y se realizaron las experiencias en las mismas condiciones que en las anteriores.

Acompañándose no sólo del testigo, sino también de otra prueba con el *corn steep* completo de cada concentración.

En la tabla número 3 se encuentran los valores obtenidos cuando el mosto fué filtrado después de agregarle el *corn steep* y ser esterilizado, los valores obtenidos con el mismo con *corn steep* sin filtrar y el testigo.

TABLA N.º 3

PRUEBA DE FERMENTACIÓN EN MOSTO CON CORN STEEP, FILTRADO Y SIN FILTRAR, CON LA ESTIRPE 107

Contenido de corn steep		Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
		1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
0,2 %	Filtrado	0,0404	0,9514	1,9923	2,6807	———	3,9987
	Sin filtrar	0,0305	1,0942	2,2219	2,9278	———	4,2503
0,4 %	Filtrado	0,0371	1,1767	2,4801	3,2963	———	4,6476
	Sin filtrar	0,0368	1,3929	2,7157	3,5012	———	4,6925
0,6 %	Filtrado	0,0376	1,2537	2,6017	3,4109	———	4,6259
	Sin filtrar	0,0436	1,8317	3,4356	4,2196	———	5,0335
0,8 %	Filtrado	0,0245	1,1628	2,5884	3,4187	———	4,6025
	Sin filtrar	0,0356	1,8566	3,5296	4,3078	———	5,0082
1,0 %	Filtrado	0,0252	0,9555	2,2684	3,0515	———	4,2409
	Sin filtrar	0,0251	1,7518	3,4713	4,1973	———	4,8199
1,5 %	Filtrado	0,0249	0,9061	2,2781	3,1294	———	4,4727
	Sin filtrar	0,0345	1,8556	3,7800	4,3448	———	4,7217
2,0 %	Filtrado	0,0249	1,1453	2,6183	3,1020	———	4,4680
	Sin filtrar	0,0226	1,8776	3,9098	4,4202	———	4,6836
	Testigo	0,0412	0,8640	1,7736	2,3710	———	3,5891

En la gráfica número 2 vienen representados estos valores con idénticas notaciones que en los casos anteriores: A, para el testigo; B a H, para el mosto con *corn steep* filtrado, y B' a H', para sin filtrar; además, las curvas que representan los valores del mosto filtrado son de trazo continuo, y las del sin filtrar, a trazos.

Las curvas que representan los valores del mosto con *corn steep* están todas por encima de la A, testigo; pero las que representan al mosto filtrado no alcanzan a los valores de las sin filtrar; nótese, por ejemplo, cómo la B' está muy por encima de la B.

IV. *Extracto alcohólico*

Se hace la extracción con alcohol de 96 por 100.

A 20 grs. de *corn steep* se le añade 100 c. c. de alcohol; el pH de la suspensión es 3,5.

Se obtiene un líquido amarillo anaranjado. Se decanta y se filtra con filtro Rosich número 4. El residuo se vuelve a tratar tres veces consecutivas con alcohol hasta agotar la extracción, y los líquidos se reúnen al primero obtenido. El último apenas tenía color.

Se destila a presión reducida, haciendo el vacío con la trompa de agua; después se pasa a una cápsula y se continúa la evaporación en baño de maría.

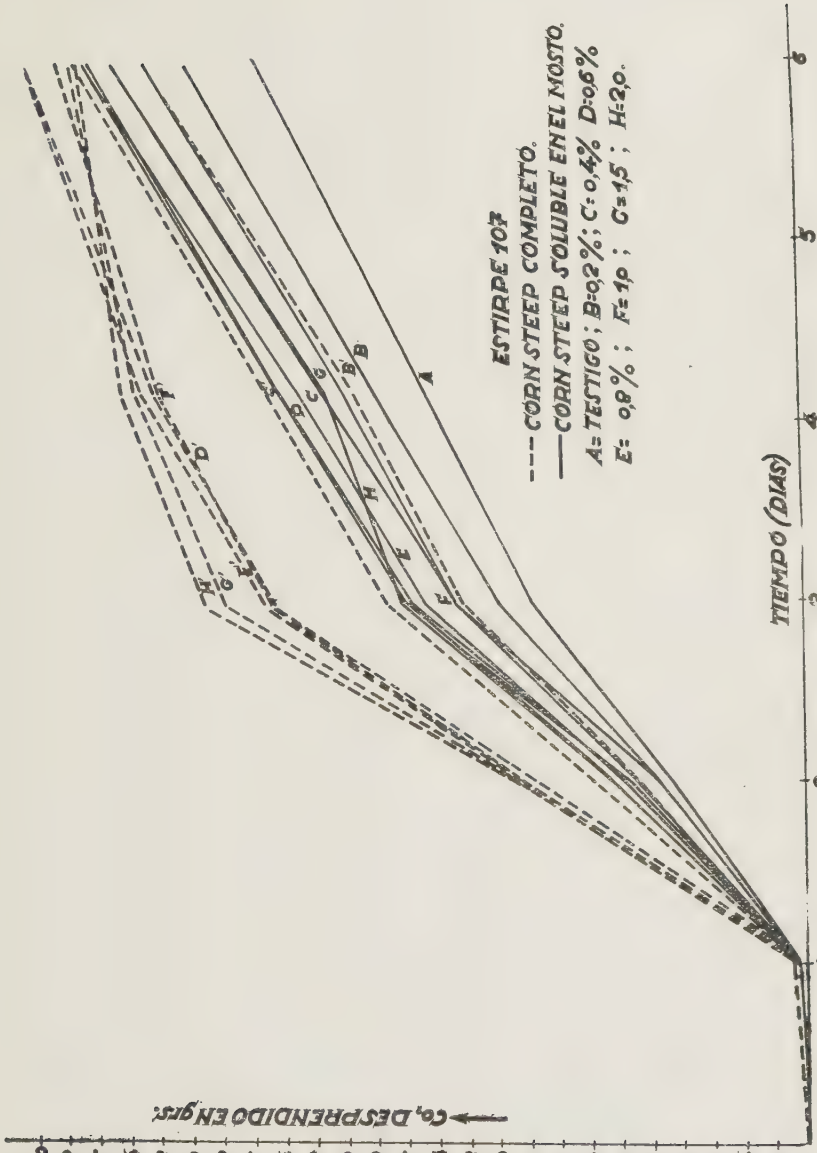
Se deseca en un desecador con Cl_2Ca, en el que se hace el vacío, y se introduce en una estufa a 40° C. durante quince días. No se obtiene un producto totalmente seco, sino una especie de resina, que es un 40 por 100 del total, de la cual fué imposible obtener un polvo seco.

La parte insoluble se desecó también a 40° C., secándose completamente, pudiendo ser fraccionada en polvo.

Se prepara mosto con estas dos partes, en concentraciones correspondientes a 0,2 y 2 por 100 total.

Se realizó la experiencia en iguales condiciones de temperatura (pH, inoculación...) que las anteriores, obteniéndose los resultados expresados en las tablas 4 y 5.

En las tablas números 4 y 5 aparecen los valores medios del anhídrido carbónico desprendido por día en los 50 c. c. de mosto, cuando a éste se le agrega la parte soluble e insoluble del *corn steep* en alcohol etílico, en


ESTIRPE 107
--- CORN STEEP COMPLETO.
—— CORN STEEP SOLUBLE EN EL MOSTO.
A= TESTIGO ; B=0,2% ; C= 0,4% D=0,6%
E= 0,8% ; F=1p ; G=1,5 ; H=2p.
TIEMPO (DIAS)
C_{O_2} DESPRENDIDO EN gms.

GRÁFICA 2

Fermentación de mosto solo, de mosto con *corn steep* y de mosto con la parte soluble del *corn steep*

proporciones de 0,2 y 2 por 100, y los obtenidos en el mosto con el *corn steep* completo y en el testigo.

TABLA N.º 4

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON CORN STEEP Y CON LA PARTE DE ÉSTE SOLUBLE EN ALCOHOL, CON LA ESTIRPE 107

Contenido de corn steep	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
0,2 % total	———	1,3341	3,2610	4,2559	———	5,4067
0,08 % p. sol.	———	1,2363	2,3814	3,1269	———	4,3971
2,0 % total	———	1,7420	3,9544	4,6012	———	5,3102
0,80 % p. sol.	———	1,1030	2,4941	3,3376	———	4,6840
Testigo	———	1,0708	2,0708	2,7359	———	4,0981

TABLA N.º 5

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON CORN STEEP Y CON LA PARTE DE ÉSTE INSOLUBLE EN ALCOHOL, CON LA ESTIRPE 107

Contenido de corn steep	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
0,2 % total	0,0674	1,2563	2,2756	2,9645	———	4,1749
0,12 % p. insol.	0,0174	1,0906	2,1351	2,8576	———	4,2792
2,0 % total	0,0682	2,7978	4,9500	5,4428	———	5,7472
1,2 % p. insol.	0,0141	1,9179	3,8533	4,9028	———	5,7618
Testigo	0,0797	0,9870	1,9134	2,5604	———	3,8532

En las gráficas números 3 y 4 están representados gráficamente estos valores. En la número 3, la curva A representa al testigo, la B y la C corresponden al mosto con la parte soluble del *corn steep* en alcohol a las concentraciones de 0,2 y 2 por 100, que además son a trazo continuo. Las B' y C' corresponden al mosto con el *corn steep* completo a las mismas concentraciones; éstas son a trazos. Puede observarse que las que repre-

sentan al mosto con la parte soluble están muy próximas a la del testigo. El alcohol etílico no ha extraído la sustancia estimuladora.

En la gráfica número 4, las curvas B y C corresponden a los valores obtenidos en el mosto con la parte insoluble del *corn steep* en alcohol; también aquí son de trazo continuo, y las B' C' a trazos corresponden al mosto con el *corn steep* completo; la A, al testigo. Puede fácilmente verse, por la proximidad de la B con la B' y la C con la C', que la parte insoluble del *corn steep* en alcohol contiene casi la totalidad de la sustancia estimuladora.

Una vez determinados los aminoácidos en el *corn steep,* comprobamos su acción en la fermentación alcohólica, para lo que realizamos las siguientes experiencias:

V. *Comprobación de la acción de los aminoácidos*

Mosto con los aminoácidos: ácido glutámico, ácido aspártico, glicina y alamina, en concentración de 0,005 por 100 solos y la mezcla de los cuatro a la misma concentración que aislados.

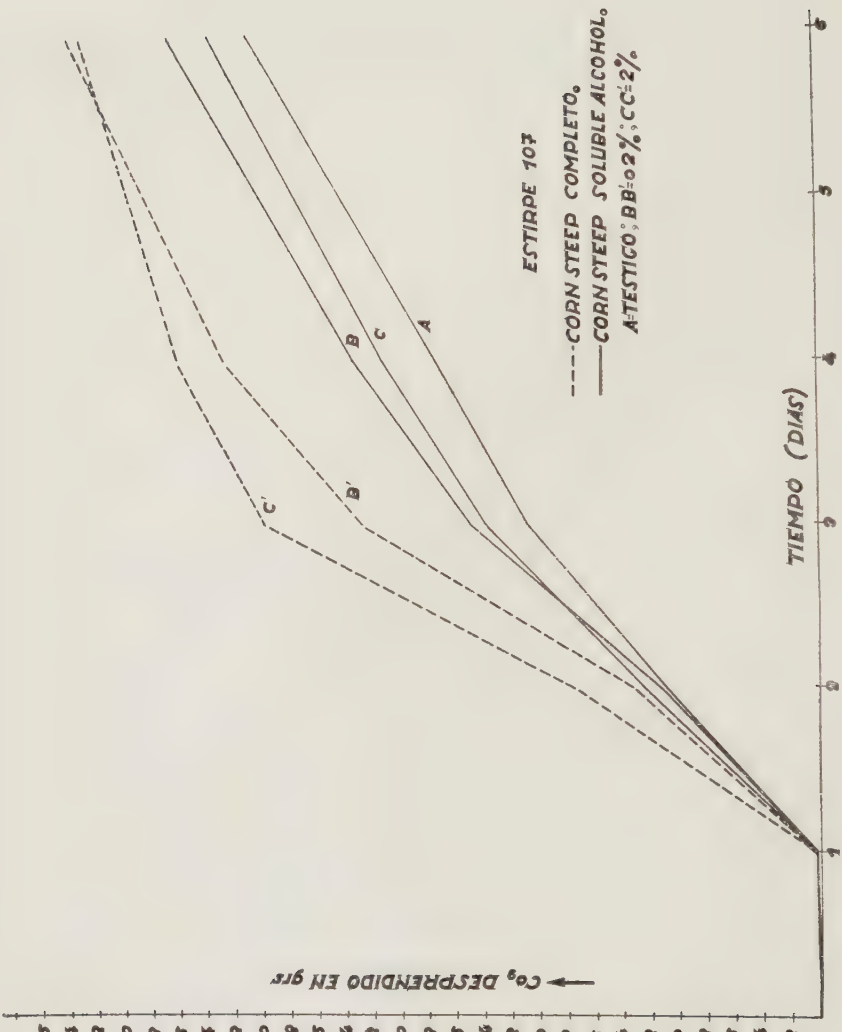
Mosto con estos aminoácidos a la concentración de 0,05 por 100, aislados y con la mezcla de todos ellos, cada uno a esta concentración.

TABLA N.º 6

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON AMINOÁCIDOS, CON LA ESTIRPE 107

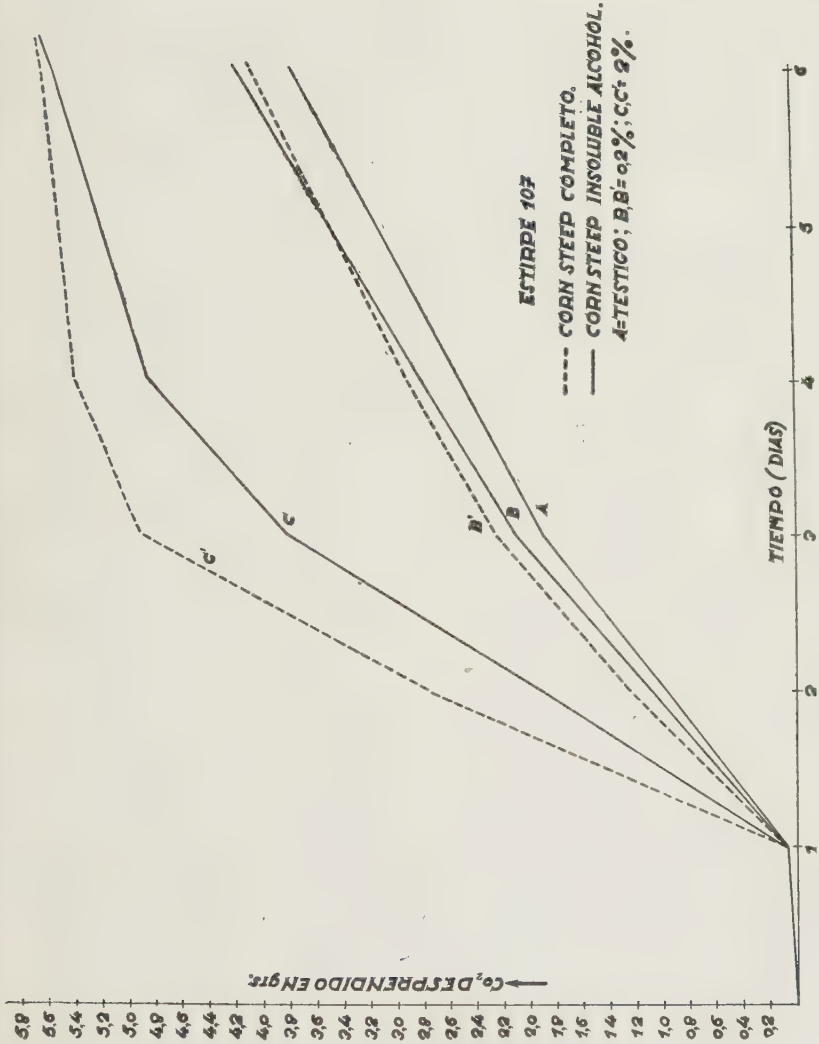
Aminoácidos 0,005 %	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
Ac. aspártico	———	0,7848	1,7545	2,3878	———	3,8129
Ac. glutámico	———	0,7912	1,6708	2,2797	———	3,5766
Glicina	———	0,8517	1,8140	2,4842	———	3,8501
Alanina	———	0,7269	1,5810	2,2127	———	3,4705
Mezcla (*)	———	0,9099	1,8717	2,5570	———	3,8713
Testigo	———	0,8062	1,7747	2,4096	———	3,8321

(*) Contiene cada aminoácido a esta concentración.



Gráfica 3

Fermentación de mosto solo, de mosto con *corn steep* y de mosto con la parte de *corn steep* soluble en alcohol.



GRÁFICA 4
Fermentación de mosto solo, de mosto con *corn steep* y de mosto con la parte de *corn steep* insoluble en alcohol.

Mosto con estos aminoácidos a la concentración de 0,1 por 100.

Se esterilizó, se inoculó con la estirpe 107 y se cultivó en idénticas condiciones que las experiencias anteriores. Los resultados vienen dados en las tablas números 6, 7 y 8.

En la tabla número 6 vienen dados los valores obtenidos cuando se le agregó al mosto los aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico, glicina y alanina a la concentración de 0,005 por 100 solos y la mezcla de todos ellos con cada uno a esta concentración. Además de los valores obtenidos como siempre en el testigo.

TABLA Nº 7.

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON AMINOÁCIDOS, CON LA ESTIRPE 107

Aminoácidos 0,05 %.	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
Ac. aspártico	0,0107	———	2,0662	2,8538	3,5165	3,9812
Ac. glutámico	0,0188	———	2,0318	2,7488	3,3325	3,7945
Glicina	0,0206	———	2,1279	3,0441	3,8164	4,3829
Alanina	0,0122	———	2,2504	3,0853	3,7573	4,2658
Mezcla (*)	0,0154	———	2,6142	3,6232	4,4371	4,8602
Testigo	0,0123	———	1,9559	2,7216	3,4149	4,0095

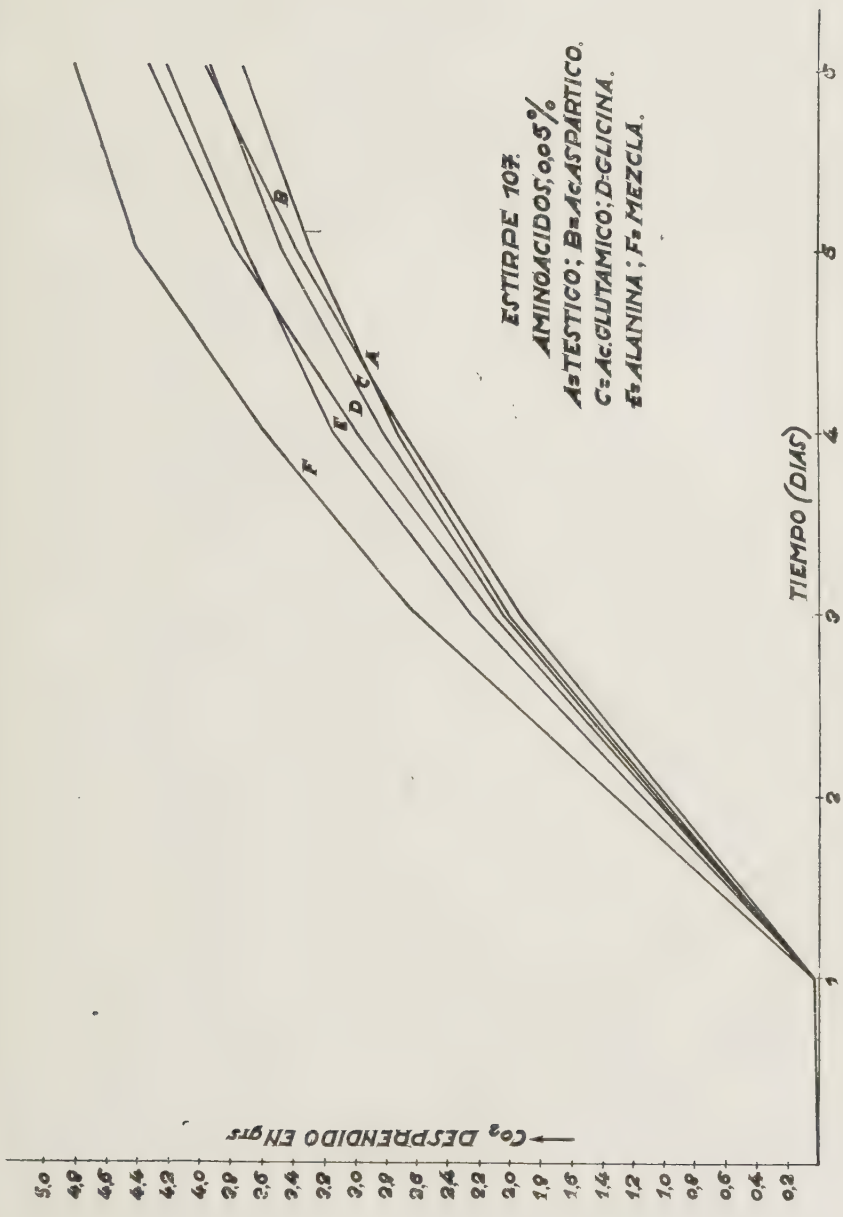
(*) Contiene cada aminoácido a esta concentración.

Como puede verse, estos aminoácidos a esta concentración tienen poco efecto, por lo que prescindimos de incluir su representación gráfica.

En la tabla número 7 se encuentran los valores obtenidos cuando se le agregó al mosto los aminoácidos ya mencionados, a la concentración de 0,05 por 100, y la mezcla de todos ellos a la misma concentración cada uno, más los valores correspondientes al testigo.

En la gráfica número 5 están representados estos valores. Las notaciones son: A para el testigo, B para el mosto con ácido aspártico, C para con ácido glutámico, D para con la glicina, E con la alanina y F para con la mezcla de todos ellos.

Puede observarse que a esta concentración cada aminoácido ejerce ya una acción estimuladora, la que está muy incrementada en la mezcla.



Gráfica 5

Fermentación de mosto solo y de mosto con aminoácidos a la concentración de 0,05 por 100.

En la tabla número 8 se encuentran los valores obtenidos cuando se le agregó al mosto estos aminoácidos a la concentración de 0,1 por 100 solos y la mezcla de todos ellos, más los del testigo.

TABLA N.º 8

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON AMINOÁCIDOS, CON LA ESTIRPE 107

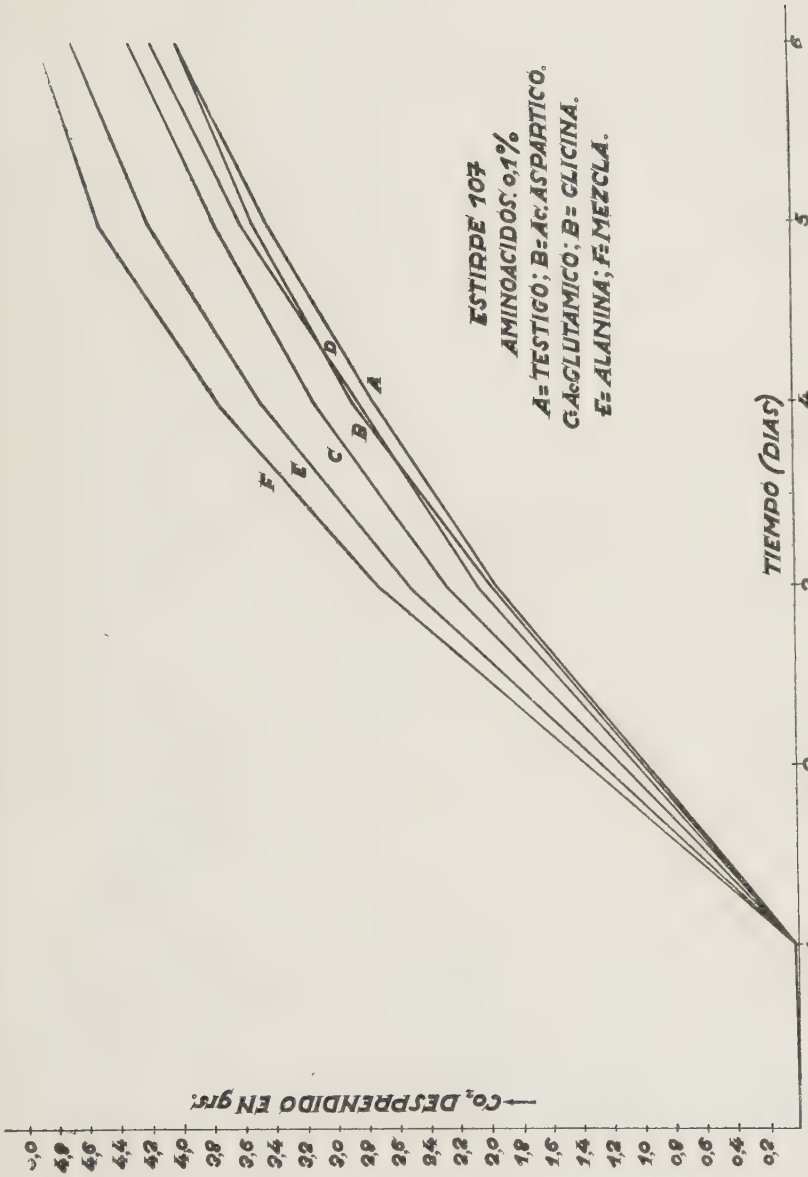
Aminoácidos 0,1 %	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
Ac. aspártico	0,0189	———	2,2709	3,1167	3,7979	4,3018
Ac. glutámico	0,0133	———	2,0727	2,8683	3,5112	3,9961
Glicina	0,0181	———	1,9754	2,8440	3,6008	4,1657
Alanina	0,0124	———	2,5273	3,4648	4,2009	4,6887
Mezcla (*)	0,0191	———	2,7245	3,7457	4,5151	4,9024
Testigo	0,0123	———	1,9559	2,7216	3,4149	4,0095

(*) Contiene cada aminoácido a esta concentración.

En la gráfica número 6 se encuentran representados estos valores. Las notaciones son las mismas que en el caso anterior. Aquí se observa que a esta concentración cada aminoácido ejerce ya una acción considerable, la que está incrementada en la mezcla.

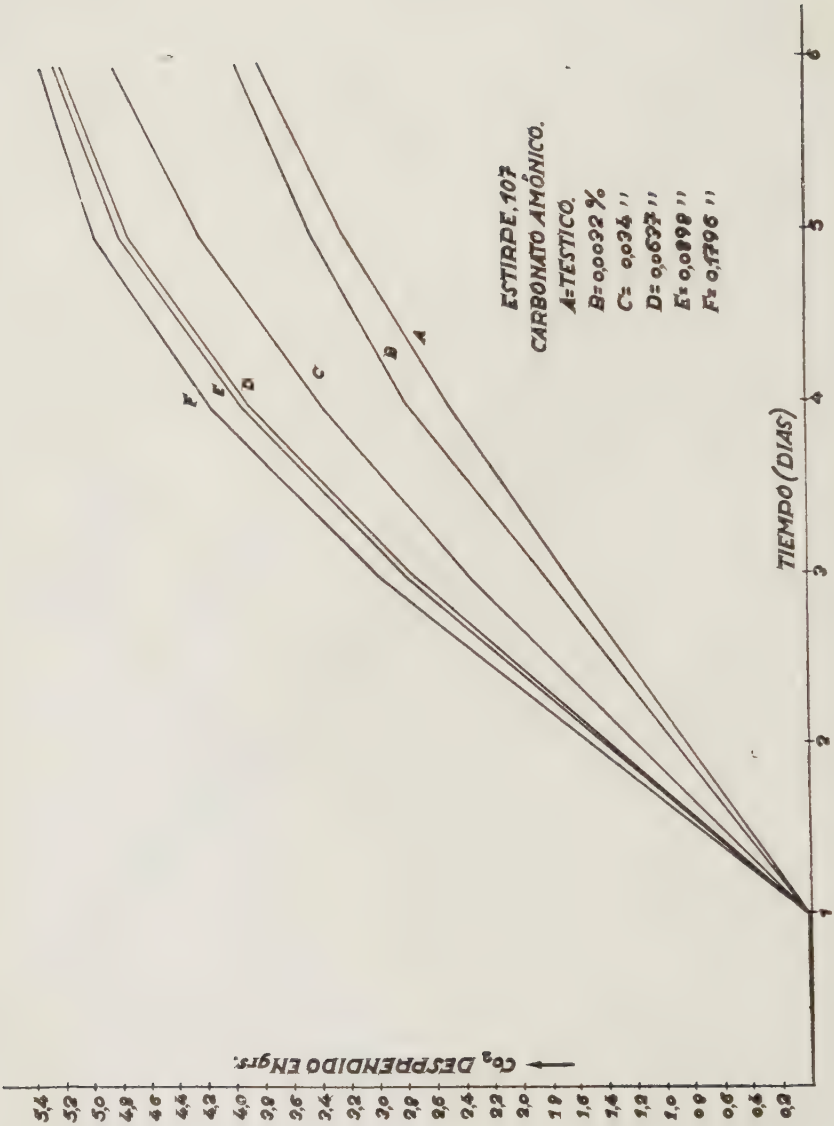
VI. *Comprobación de la acción del carbonato amónico*

Temiéndose que la acción del *corn steep* en nuestro caso se redujese a un gran aporte de nitrógeno, se repitieron estas experiencias, sustituyendo el N. amínico de los aminoácidos por N. amoniacal, más fácilmente asimilable, en forma de carbonato amónico, en cantidades equivalentes al contenido en la glicina (aminoácido con mayor porcentaje de N.) a las concentraciones de 0,005, 0,05 y 0,1 por 100, y el equivalente al contenido en la mezcla de todos ellos a las concentraciones de 0,05 y 0,1 por 100. Como siempre, se acompañó de un ensayo testigo.



GRÁFICA 6

Fermentación de mosto solo y de mosto con aminoácidos a la concentración de 0,1 por 100.



Gráfica 7

Fermentación de mosto solo y de mosto con carbonato anónico.

Los resultados vienen expresados en la tabla número 9.

TABLA N.º 9

PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE MOSTO CON CARBONATO AMÓNICO, CON LA ESTIRPE 107

Carbonato amónico	Grs. de CO_2 desprendidos en 50 c. c. de mosto					
	1.er día	2.º	3.er	4.º	5.º	6.º
0,0032 %	0,0121	———	1,8164	2,7845	3,4210	3,9385
0,0318 %	0,0148	———	2,3336	3,3698	4,2084	4,7848
0,0637 %	0,0171	———	2,7017	3,8648	4,7011	5,1577
0,0898 %	0,0303	———	2,7321	3,9358	4,7891	5,2065
0,1796 %	0,0112	———	2,9623	4,1411	4,9389	5,3018
Testigo	0,0164	———	1,6738	2,4898	3,2027	3,7733

En la figura número 7 se encuentran representados estos valores con las notaciones A para la curva testigo, B para la que representa al mosto con 0,0032 de carbonato amónico, C con 0,0318, D con 0,0637, E con 0,0898 y F con 0,1796 por 100. En ella se puede observar cómo un aporte de nitrógeno en cantidades pequeñísimas, en forma de ion amonio, ocasiona una aceleración considerable en la fermentación alcohólica.

DISCUSION

Como se desprende de la tabla número 1 y la gráfica número 1, el *corn steep* tiene una acción estimuladora muy marcada en la fermentación alcohólica, sobre todo en los dos o tres primeros días, pues la cantidad de glucosa transformada en el mosto con *corn steep* es casi doble de la que se transforma en el mosto que no lo tiene. Esto se debe, probablemente, a que la levadura, en presencia de esta sustancia rica en compuestos nitrogenados, incrementa su acción fermentadora, ya que no se ha podido demostrar que ésta correspondiera a una mayor multiplicación de la levadura, pues no se han encontrado diferencias notables en el número

de éstas, ni por recuento microscópico en la cámara de Thomas (*), ni por turbidez con el nefelómetro, ni tampoco por el peso de la levadura centrifugada y lavada con agua destilada y finalmente desecada a 105° C.

De acuerdo con las experiencias de Moyer y Coghil (18, 21), de Knight y Fracier (12) y Koffler y colaboradores (11), hemos investigado la acción de la parte mineral del *corn steep* por adición de las cenizas de éste al mosto, para ver si la acción estimuladora se debía a algún elemento; pero no se obtuvo ninguna acción, en nuestro caso, a ninguna concentración.

Con respecto a la penicilina, los primeros autores citados no consiguieron una acción muy marcada por adición de distintos elementos traza, mientras que los últimos obtuvieron un efecto casi análogo al del *corn steep* completo, empleando sólo las cenizas, y comprobaron que esta acción era debida casi totalmente al hierro y fosfatos que el *corn steep* lleva.

Con respecto a si la parte activa se encontraba en la parte soluble o insoluble en mosto del *corn steep*, parece ser, como se deduce de la tabla número 3 y de la gráfica número 2, que parte de esta acción estimuladora se encuentra en la parte soluble, pero que no alcanza la misma intensidad que con el *corn steep* completo.

De las experiencias hechas con los extractos alcohólicos se deduce que estas sustancias activadoras son poco solubles en alcohol etílico, pues, aunque los extractos se llevaban parte de esta acción estimuladora, la mayor parte de esta acción quedaba en la parte insoluble, como puede verse en las tablas números 4 y 5 y gráficas números 3 y 4, lo que no está de acuerdo con los trabajos de White, Kramptzy y Werkman (31) con respecto a la producción de penicilina, que encontraron que esta sustancia activa se encontraba en el extracto etílico, la que ellos precipitaban con ácido pícrico, que después descomponían con sulfúrico y decían ser una mezcla de sustancias nitrogenadas.

En lo que sí estamos de acuerdo con White, Kramptzy y Werkman (31) es que también en nuestro caso son los aminoácidos contenidos en el *corn steep* los que ejercen gran parte de esta acción estimulante, pues hemos conseguido separar, por análisis cromatográfico, seis aminoácidos, que han sido identificados como ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, treonina y alanina, por tener su Rf. igual a las soluciones standar de estos aminoácidos, como puede verse en las figuras números 2 a 5.

(*) Muy inexactos estos valores por estorbar el recuento los grumos del *corn steep*.

Ya Cardinal y Hedrick (4) había determinado por métodos microbiológicos los aminoácidos del *corn steep*. De estos aminoácidos encontrados se añadieron: los ácidos aspártico, glutámico, glicina y alanina, en concentraciones de 0,005, 0,05 y 0,1 por 100 al mosto, y como se deduce de las tablas, no tenían ninguna acción a la concentración de 0,005, ni aislados, ni en la mezcla de todos ellos, pero ya a la concentración de 0,05 tienen una marcada acción; esta actividad es superada por la mezcla de todos ellos. A la concentración de 0,1 gr. por 100 nos encontramos que se incrementan las acciones de todos ellos aislados y la de la mezcla. Es de notar que, en un análisis cromatográfico de un extracto alcohólico de levadura de panadería, se encontraron estos aminoácidos, y en el residuo de levadura se encontraron: ácido glutámico, aspártico, glicina e isoleucina. (Tabla 59 de F. Turba) (25).

De todas estas consideraciones y de la comprobación hecha por nosotros sobre el efecto ejercido por el N. amoniacal, creemos que la influencia estimuladora del *corn steep* es debida, en gran parte, al aporte de N. de su contenido en aminoácidos.

CONCLUSIONES

1) El *corn steep* ejerce una marcada acción en el curso de la fermentación alcohólica, reduciéndose considerablemente el tiempo necesario para fermentar una cantidad de sustancia con adición de *corn steep*.
2) La parte mineral del *corn steep*, ensayada por la adición de sus cenizas, no ejerce acción alguna sobre el curso de la fermentación, descartándose la posibilidad de que sean los elementos trazas que ésta lleva los responsables de esta acción.
3) La parte del *corn steep* estimuladora de la fermentación es parcialmente soluble en el mosto y no extraída por alcohol etílico.
4) Esta acción estimulante del *corn steep* en la fermentación creemos es debida a su contenido en compuestos nitrogenados, como son los aminoácidos encontrados por análisis cromatográfico: ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, treonina y alanina.
5) El carbonato amónico, en pequeñas concentraciones, ocasiona un incremento de la fermentación tan considerable como la adición del *corn steep*.

RESUMEN

Se estudió el efecto del *corn steep* en la fermentación alcohólica, habiéndose encontrado que se acelera la fermentación considerablemente por la adición de esta sustancia.

Se trató de encontrar la parte del *corn steep* que ejercía esta acción estimuladora, y se llegó a la conclusión de que era debida a su contenido en compuestos nitrogenados.

RÉSUMÉ

Nous avons travaillé sur le effects que produit le *corn steep* pendant le proces de le fermentation alcoholique; nous avons trouvé qu'il augmente la rapidité de la fermentation d'un façon considerable.

Nous avons èsayé de dècouvrir quelle partie du *corn steep* produisait cette action estimulatrice y nous sommes arrivés à la conclusion qu'elle etait dûe à son contenu en composés azotés.

ZUSAMMENFASSUNG

Man hat die Wirkung des *corn steep* auf die alkoholische Gärung studiert. Bei Zusatz dieses Stoffes wird die Gärung beschleunigt.

Man hat sorgfältige Untersuchungen angestellt uber die Bestandteile des *corn steep,* welche diesen Efeckt bewirken. Wir glauben, dass er auf den Aminosäurengehalt zurückzuführen ist.

BIBLIOGRAFIA

(1) Bern, A. 1909. Food product and process of makings same U. S. U. G. patent, n.º 914, 376.

(2) Block, R. J., Le Strange, R. and Zweig, G. 1952. Paper Chromatography. A Laboratory Manual. Academic Press. New York.

(3) Bowden, J. P., and Peterson, W. H. 1946. The role of corn steep in the production penicillin. Arch. Biochem. 9, 387.

(4) Cardinal, E. V. and Hedrice, L. R. 1948. Microbiological assay of corn steep for amino acids content. J. Biol. Chem. 172, 609-612.

(5) Consdeg, R., Cordon, A. T. and Martin, A. J. P. 1944. Qualitative Analysis of proteins: a partition chromatography method using paper. Biochem. J. 38, 224.

(6) Corn Industries Research Foundation, 1937. Corn Industry.

(7) Draper, O. J. and Pollard, A. 1949. The purification of phenol for paper partition chromotagraphy. Science. 109, 448, 9.

(8) File, H. Severage production. U. S. Patent. n.º 2.068, 378.

(9) Greenfield, R. D., Cornell, G. N. and Hatfiel, W. D. 1947. Corn. starch process. Ind. Eng. Chem. 39, 583, 588.

(10) Kerr, R. W. 1944. Chemistry and industry of starch. Acad. Press. Inc., New York.

(11) Koffler, H. Knight, S. J. and Frazier, W. C. 1947. The effect of certein mineral elements on the production of penicillin fermentation on syntetic media. J. Bact. 53, 115-123.

(12) Knight, S. G. and Frazier, W. C. 1945. The efect of corn steep liquor ash on penicillin production. Science, 102, 617, 618.

(13) Leeg, D. A. and Christerse, L. M. 1932. Process for the production of organic acids from cellulosic material. U. S. Patent n.º 864,746.

(14) Ligget, R. W. and Koffler, H. 1948. Corn steep liquor in Microbiology Bacte. Re. 12, 297, 311.

(15) Lockwood, L. A. and Reeves, M. D. 1945. Some factors afecting the production of itaconic acid by A. terreus. Arch. Biochem. 6, 455, 469.

(16) Loockwood, L. R. and Ward, G. E. 1945. Fermentation process for itaconic acid. Ind. Eng. Chem. 37, 405, 406.

(17) Meissl, Lindner. Mikroskopische und Biologische betriebskontrolle in den Gärungagewerben. 1930, 288.

(18) Moyer, A. J. and Coghill, R. D. 1946. Penicillin VIII. Production of penicillin in surface cultures. J. Bact. 51, 57, 78.

(19) Moyer, A. J. and Coghill, R. D. 1945. The Laboratory scale production of itaconic acid by Aspergillus terreus. Arch. Biochem. 7, 167, 341.

(20) Moyer, A. J., Neuberger, E. J. and Stubbs, J. J. 1940. Fermentation of concentrated solutions of glucose to gluconic acid. Ind. Eng. Chem. 32, 1378, 1383.

(21) Moyer, A. J. and Coghill, R. D. 1946. Penicillin IX. The laboratory scale production of penicillin in sumerged cultures by penicillium notatum. Westling (NRRL, 832). J. Bact. 51, 115, 123.

(22) Pollac, A. 1938. Products to improve the quality of bread. French Patent. n.º 845,185.

(23) Stubbs, J. J. Lockwood, L. B. Roe, E. T., Tabenkin, B. and Ward, G. E. 1940. Ketogluconic acids from glucose. Bacterial production. Ind. Eng. Chem. 32, 1926, 1631.

(24) Tanner, F. W. Pfeiffer, S. E. and Van Lanen, J. M. 1945. Vitamin and protein content of residues from the production of penicillin by submerged fermentation. Arch. Biochem. 8, 29-36.

(25) Turba, Fritz. 1954. Cromatographische Methoden in der Protein-Chemie, Springer-Verlag. Berlin. Göttingen. Heidelberg.

(26) Wagner, T. B. 1922. Yeast and process of making the same: U. S. Patent n.º 1434, 462.

(27) Wagner, T. B. 1928. Yeast stimulanis and process of using them U. S. Patent n.º 1680, 827.

(28) Wagner, T. B. and Glaban, C. A. 1927. Art of producing leaven-oklough products. U. S. Patent n.º 1, 649, 144.

(29) Walsh, J. F. and Morgan, W. L. 1939. Process for preparing a brewig adjunct. U. S. Patent n.º 2, 144, 471.

30) Wells, P. A. Locwood, L. B., Stubbs, J. L. Roe E. T., Porges, N. and Gastrock. E. A. 1939. Sorbosse from sorbitol. Semiplant-scale production by Acetobacter suboxilans. Ind. Eng. Chem. 31, 1518, 1521.

(31) White, A. G. C., Kramptzy, L. O. and Werkman, C. H. 1945. Arch. Biochm. 8, 303.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN» DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE MICOLOGIA

UNA NUEVA ESPECIE DE *ENDOMYCES* REES.: *ENDOMYCES OVETENSIS* NOV. SP.

POR

FERNANDO PELÁEZ CAMPOMANES y CARLOS RAMÍREZ GÓMEZ

Este microorganismo ha sido aislado de un baño curtiente de 6° Bé., compuesto de un concentrado de taninos del tipo Quebracho.

Sus características morfológicas, tales como el tener verdadero micelio, que se fragmenta fácilmente en artrosporas ovaladas o cilíndricas; multiplicarse vegetativamente por tabicación; el poseer células especiales (gametangios), nacidas del micelio o de células sueltas, previa conjugación de dos células miceliares, tanto libres (artrosporas), como unidas, formando micelio, o de células procedentes de micelios distintos, nos hace considerar este microorganismo como perteneciente al género *Endomyces* Reess, aunque está algo relacionado con *Endomycopsis*, por producir en el extremo del micelio células parecidas a blastosporas, pero que ulteriormente se alargan y se tabican.

CONSIDERACIONES HISTORICAS SOBRE EL GENERO

El género *Endomyces* fué creado por Reess en 1870. Según dicho autor, este género difiere de *Saccharomyces* por la formación de micelio verdadero, carácter que falta en este último.

Guilliermond (1928) define con más precisión el género. Distingue en él dos grupos: A y B.

En el grupo A se forma micelio verdadero, que se fragmenta en artrosporas. Las ascas se forman por gemación a partir de las células miceliares. Los hongos, con idénticos caracteres, pero en los que nunca se forman ascas, se incluyen en el género *Geotrichum* Link.

En el grupo B existe también micelio verdadero, que en algunas pocas especies se fragmenta en artrosporas. Sin embargo, el micelio forma siempre blastosporas por gemación. Las ascas se producen por gemación en el micelio, en las artrosporas, o las blastosporas se transforman en ascas. Las ascosporas pueden formar tanto micelio verdadero como células de levadura.

Stelling-Dekker (1931) limita el género *Endomyces* al grupo A de Guilliermond. Para las especies pertenecientes al grupo B crea el género *Endomycopsis,* que incluye dentro de la subfamilia *Saccharomy cetoideae.*

Recientemente, Windisch (1951) ha estudiado con detalle el *Geotrichum lactis* y otros organismos afines, habiendo observado formas que ha interpretado como ascas. Teniendo en cuenta esta formación de ascosporas, Windisch incluye estos microorganismos en el género *Endomyces,* distinguiendo una especie y tres variedades.

Según lo que acabamos de señalar, se consideran pertenecientes al género *Endomyces* las siguientes especies y variedades:

Endomyces decipiens (Tulasne) Reess.

Endomyces magnusii Ludwig.

Endomyces lactis (Fres.) Windisch.

Endomyces lactis (Fres.) Windisch var. fragrans (Berkh.) Windisch.

Endomyces lactis (Fres.) Windisch var. matalensis (Cast.) Windisch.

Endomyces lactis (Fres.) Windisch var. klebahnii (Stautz) Windisch.

Pero el organismo que motiva el presente estudio presenta marcadas diferencias, tanto morfológicas como fisiológicas, con las especies y variedades mencionadas anteriormente. Lo consideramos como una nueva especie dentro de este género.

DESCRIPCION

A las cuarenta y ocho horas en extracto de malta a 25° C., se observan células miceliares (aparentemente semejantes a células de levadura, por ser ovaladas, pero que, en lugar de multiplicarse por gemación, lo hacen

FIG. 1.
Endomyces ovetensis, nov. sp. en extracto de malta, a las 48 horas, a 25º C. 1000 ×

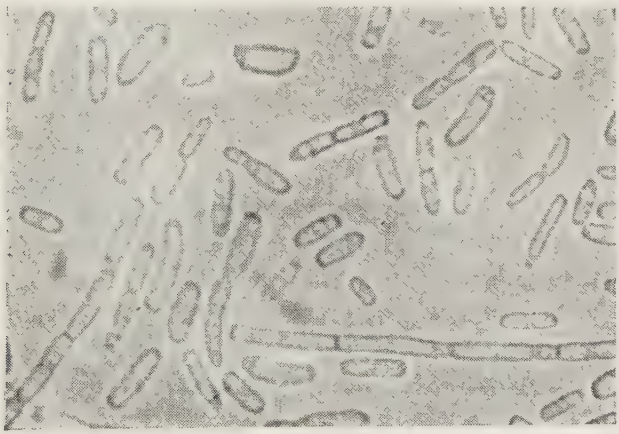


FIG. 2.
Células en malta, a las 48 horas (450 ×)

por tabicación), de (3,5-7) (8-30) micras, trozos de micelio y artrosporas más o menos cilíndricas. Forma un velo mucoso y caedizo y abundante depósito (figs. 1 y 2).

Al cabo de un mes, a 18° C., forma velo mucoso y caedizo y abundante depósito.

La estría en agar malta, después de un mes a 18° C., es blanda, abultada en el centro, ligeramente granulosa, de color amarillo sucio, con franja de micelio en los bordes. De brillo céreo.

Cultivo sobre porta.—En agar-patata se observa micelio con células levaduriformes ovaladas, que podrían confundirse con blastosporas, pero que, con el tiempo, se alargan y se tabican. Estas, al desprenderse prematuramente con facilidad, pueden confundirse con células de levadura (figura 4).

FIG. 3.

Endomyces ovetensis, nov. sp. Esporas liberadas de las ascas y agrupadas. 1000 ×

Esporulación.—Sobre medio de esporulación de Adams (1950), sobre medio V8 (Wickerham y otros, 1946) y sobre agar-patata se observan ascas formadas después de conjugarse dos células contiguas del micelio, o una célula libre y una célula del micelio, o dos células pertenecientes a micelios distintos, o dos células libres (fig. 5). Las esporas son ovaladas, de membrana extraordinariamente gruesa. Su número máximo no ha podido ser determinado, pero probablemente sea de ocho o más. El mínimo es de una espora por asca. Las ascas se rompen con facilidad, liberando las esporas, que permanecen adheridas unas a otras. Sus dimensiones oscilan entre (7-9) (4-6) micras (fig. 3).

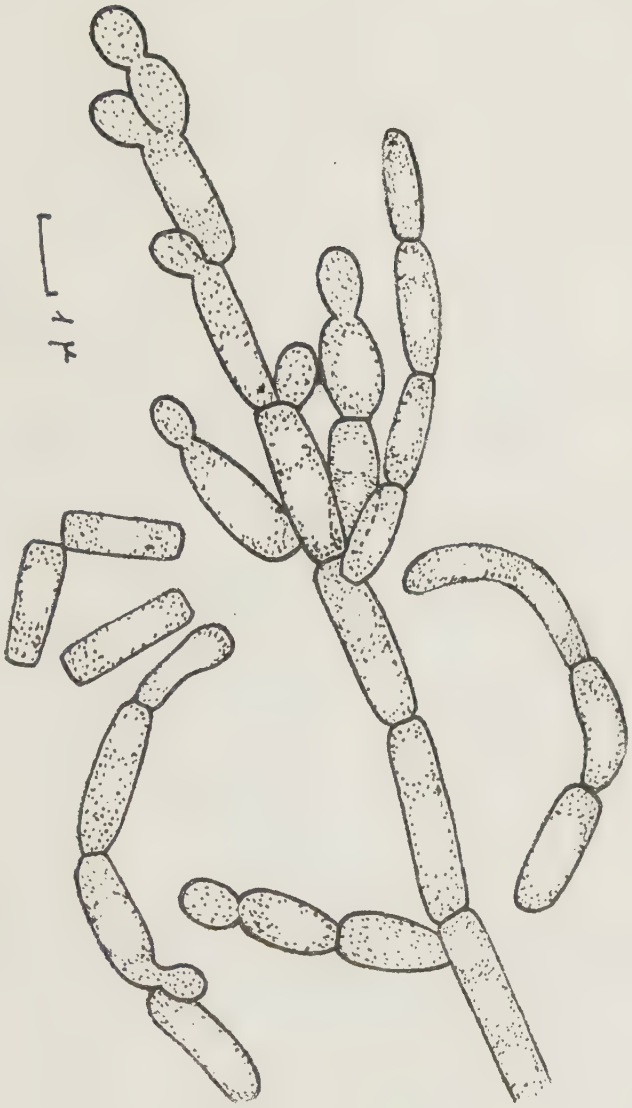


FIG. 4.

Endomyces ovetensis, nov. sp. Cultivo sobre agar patata, en el que se observa la estructura del micelio. 1000 ×

Fermentación: Nula.

Asimilación de azúcares:

Glucosa	+	Maltosa	—
Galactosa	+ (d)	Lactosa	—
Sacarosa	+ (d)		

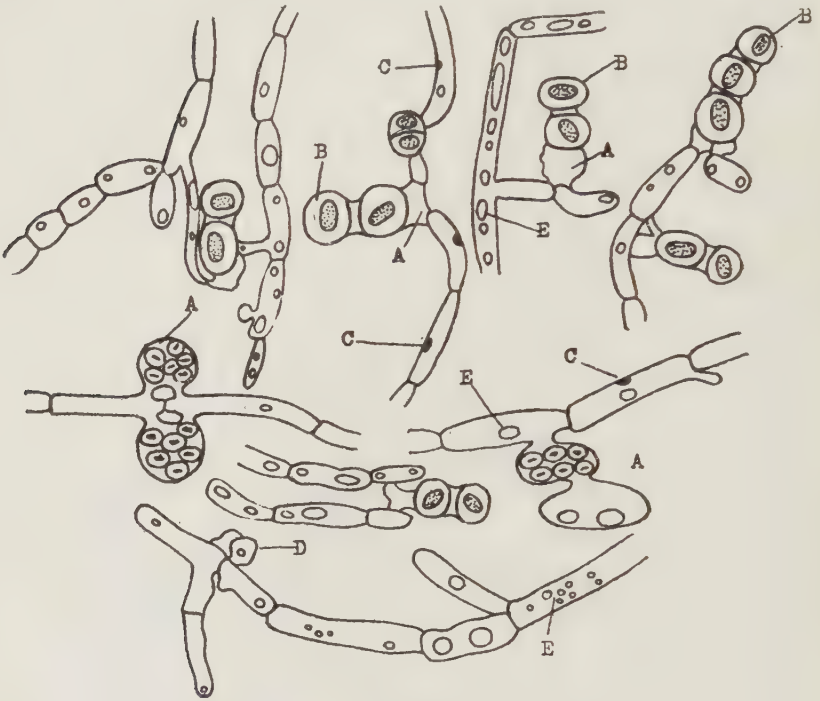


FIG. 5.

Endomyces ovetensis. Cultivo sobre medio de Adams, mostrando diversas formas de copulación. A. Ascas.—B. Esporas.—C. Núcleo.—D. Dos células contiguas del micelio en el momento de emitir los tubos de copulación.—E. Gotas de grasa. 1000 ×

Asimilación de fuentes de N:

Peptona	+
NO_3K	—

Asimilación de alcohol: Negativa.

Hidrólisis de la arbutina: Negativa.

Las diferencias de este microorganismo con *Endomyces decipiens* (fig. 6) son marcadas, en cuanto a las medidas y morfología del micelio,

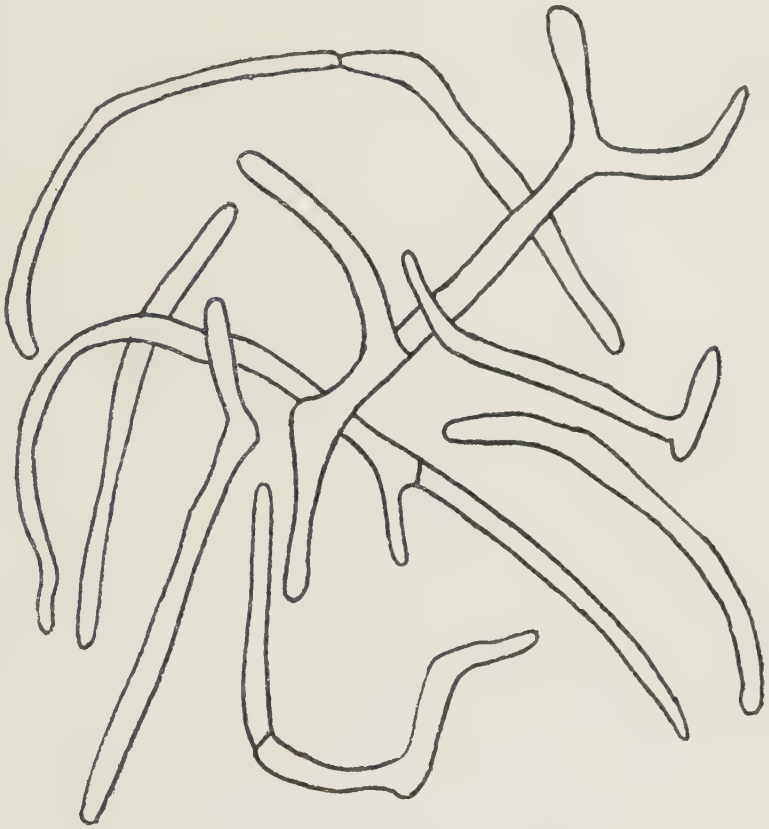


FIG. 6.
Endomyces decipiens (Tul.) Reess. (Según Stelling-Dekker). En extracto de malta, a las 48 horas, a 25° C. 1000 ×

forma de las esporas (en forma de sombrero), asimilación positiva de alcohol con formación de velo. La asimilación de los azúcares no ha podido compararse por no haber sido indicada por los autores. De *Endomyces magnusii* (fig. 7) se diferencia por la morfología y por fermentar este

último la glucosa, galactosa y sacarosa. De *Endomyces lactis* (fig. 8) se diferencia morfológicamente y porque este último sólo asimila la glucosa y la galactosa (débilmente).

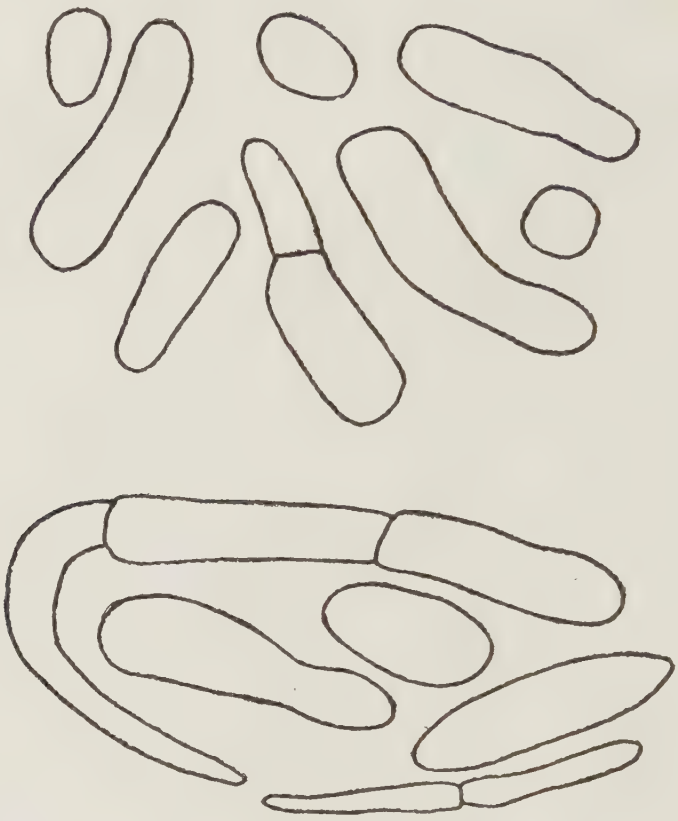


FIG. 7.
Endomyces magnusii Ludwig (Según Stelling-Dekker). En extracto de malta, a las 48 horas, a 25° C. 1000 ×.

Por lo que creemos tener suficientes razones para hacer de este organismo una nueva especie, para la que proponemos el nombre de *Endomyces ovetensis* (nov. sp.) (*).

(*) Esta cepa figura en la colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, de Madrid, con el núm. 288.

DIAGNOSIS LATINA

In musto maltato mycelio vero cum arthrosporis. Arthrosporae ovoideae aut cylindricae (3,5-7) (8-30). Sedimentum et pellicula mucosa formantur. Pellicula facile cadet at fundum.

Cultura in agaro maltato (post unum mensem, 18° C.) mollis, crispu-

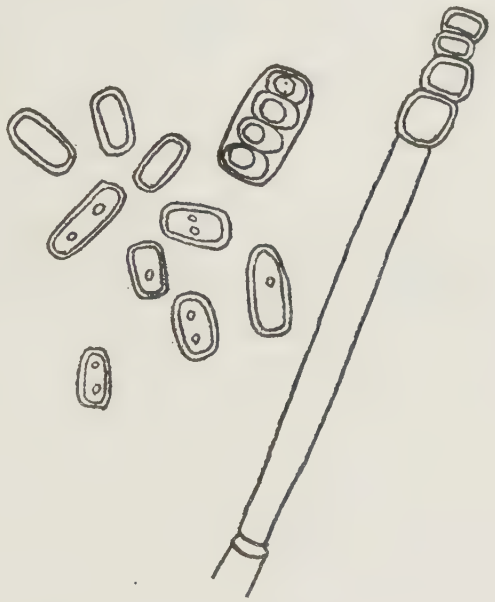


FIG. 8.
Endomyces lactis (Fres.) Windisch (original). Cultivo sobre porta, en agar-patata. 1000 ×

lata in parte media, parum granulosa, flava sordida, margine piloso. Mycelium verum cum arthrosporis sed sine blastosporis.

Copulatio cellularum myceliarum conformationi asci plerumque praecedit. Ascosporae satis magnae, ovoideae, cum membranis maxime crassi. 1-8 aut plus in asco.

Fermentatio: nulla. In medio minerali cum glucoso, galactoso (exigue) sacharoso (exigue) crescit. Nitras kalicus non assimilatur. In medio minerali cum alcohole aethylico non crescit. Arbutinum non finditur.

SUMMARY

The authors describe a new species of yeast which have been isolated from a tanning liquid. After its characteristics it is included in the genus *Endomyces* Rees and is stated that it has relationships with the genus Endomycopsis.

They made some historical considerations about the genus *Endomyces* and describe the *Endomyces ovetensis nov. sp.* in detail, showing its differences with all the species in this genus. The latin diagnosis of this yeast is included.

BIBLIOGRAFIA

Adams, A. M. Biol. Abstract, 24, 1950.

Guilliermond, A. Clef Dichotomique pour la détermination des levures. París, 1928.

Reess, M. Botanische Untersuchungen uber die Alkohogarungspilze. Leipzig, 1870.

Stelling-Dekker, N. M. Die sporogenen Hefen, Verhandel. Koninkl. Akad. Wete-schap. Afd. Natuurkunde, sect. II, 28: 1, 1931.

Wickerham, L. J., M. Flickinger and K. A. Burton, J. Bact. 52: 611, 1946.

Windisch, S. Beitrage Biol. Pflanzen, 28: 69, 1951.

INSTITUTO PROVINCIAL DE SANIDAD DE LA CORUÑA
SECCION DE BACTERIOLOGIA

EL ASPECTO ESTRUCTURAL BIOQUIMICO Y GENETICO DEL BACTERIOFAGO. REVISION DE CONJUNTO

(Conclusión.)

POR
FEDERICO BEATO Y GONZÁLEZ

VI. LISOGENIA Y BACTERIOFAGO

1. *Introducción al estudio de la lisogenia*

La lisogenia es el poder hereditario a producir bacteriófago. Un germen lisogénico es una bacteria que posee y tiene el poder de producir fago. Cada bacteria de una determinada cepa lisogénica da lugar a un «clone» lisogénico. La mayoría de los individuos de una población lisogénica no produce bacteriófago. Los fagos son únicamente producidos por un pequeño porcentaje de bacterias y son liberados por lisis bacteriana. La expresión de lisogenia, siendo letal, ella solamente puede ser perpetuada con un carácter en potencia. Una determinada bacteria lisogénica puede producir uno o varios tipos de fago. Cuando una bacteria no lisogénica es infectada y lisogenada con un determinado fago, la raza lisogénica produce el fago original. Así, la bacteria lisogénica perpetúa una estructura específica. Pero si se rompe una bacteria lisogénica, no son liberadas partículas infecciosas. La lisogenidad es mantenida en la forma de una estructura no infecciosa. Esta estructura, no específica, dotada de continuidad genética, es denominada «profago».

Profago es la forma con que la bacteria lisógena perpetúa el poder a producir fago. Su multiplicación está relacionada con la reproducción

bacteriana. Parece estar localizado en un lugar específico de un determinado cromosoma bacteriano y se comporta en los cruces como un gene bacteriano. Interesa resaltar que los conceptos de profago y lisogenia son distintos. El prófago es concebido como el soporte material de la continuidad genética del bacteriófago en la bacteria lisógena. La lisogenia es la posibilidad, para determinados gérmenes que contienen el profago, de producir fagos.

Ahora bien, cualquier fago, al penetrar en una bacteria, pierde su poder infeccioso en el intervalo entre el comienzo de la síntesis del DNA y la aparición del fago infectivo; la partícula sólo puede ser demostrada con la reacción de fijación del complemento (Rountre-150a). Si el fago se origina, es decir, si la infección es productiva, la partícula infecciosa entra en la fase vegetativa del ciclo de vida. Durante esta fase vegetativa, el material genético del fago se multiplica en la forma de gonofago, y las proteínas específicas del fago son sintetizadas, como ya en otro lugar hemos dicho, junto con el ácido nucleico. La fase vegetativa culmina en la organización, en la maduración de la partícula fago. Cuando la infección es de tipo reductivo, enfonces la bacteria es lisogenada y el material genético del fago infectante es reducido al estado de profago. En algunos sistemas lisogénicos la producción espontánea del fago puede ser inducida, como hemos de examinar, por la acción de determinados agentes físicos o químicos. Los agentes inducientes no desenmascaran partículas encubiertas; ellos convierten el profago en gonofago, y la fase vegetativa del ciclo es de esa manera iniciada. Las bacterias lisogénicas son inmunes hacia el fago homólogo, que es absorbido, penetrando dentro de la bacteria, pero no es replicado. Aunque el material genético del fago infectante puede sobrevivir por varias generaciones bacterianas, se conduce como partículas citoplásmicas inertes, que no se desarrollan. En una bacteria inmune, la reacción que conduce al estado vegetativo es bloqueada. Bacterias lisogénicas pueden ser curadas de su lisogenia. Las razas no lisogénicas que resultan pierden su inmunidad original, que es recuperada por lisogenación. En una bacteria lisogénica, fagos infectantes relacionados no pueden, generalmente, ser reducidose a profago, existe una auténtica incompatibilidad. Ello parece como si la reducción a profago sólo puede efectuarse en un determinado y específico lugar de la bacteria, que, cuando está ocupado por el profago, no hay posibilidad de acomodar el nuevo infectante y relacionado fago. En una bacteria lisogénica, la inmunidad es una consecuencia de la presencia de profago. El

desarrollo del bacteriófago puede tener lugar solamente si la inmunidad es perdida, esto es, cuando el profago cesa en su estado de profago y deja de ser esto.

El poder a lisogenizar es la característica de los fagos moderados, en oposición a los virulentos. Este poder puede disminuir por mutación, y puede también perderse. Por otra parte, los fagos moderados pueden producir mutantes virulentos, y algunos de estos fagos virulentos tienen la propiedad de inducir el desarrollo de un profago relacionado. Estos fagos virulentos y moderados pueden ser cruzados. El carácter virulento se conduce en los cruces como otro carácter genético del fago.

2. *El profago*

Lwoff y Gutmann (18) propusieron el nombre de probacteriófago o profago a aquellas partículas no infectantes con continuidad genética, y ha sido definido como la forma en que la bacteria lisogénica perpetúa el poder a producir bacteriófago. Ya que la expresión de lisogenia es letal. el profago puede ser considerado como un factor letal en potencia; podemos concebir una bacteria lisogénica como una bacteria que posee la capacidad genética a producir y transmitir fagos.

Ahora bien, una raza lisogénica produce fagos idénticos al tipo original. Para responder a este hecho fundamental tenemos que admitir, con Burnet y Mckie (10), que la bacteria lisogénica perpetúa un principio lítico específico, denominado el profago. ¿Qué es, pues, el profago? La hipótesis de que la bacteria lisogénica perpetúa un bacteriófago no patogénico, ha sido ya en otros tiempos aceptada. Sin embargo, muchos hechos hay en contra de este punto de vista. De que el profago no es ni una partícula fago enmascarada, ni un fago en fase vegetativa de su ciclo de vida, es cosa que se hace evidente del estudio de la inmunidad. Por otra parte, la ruptura de una bacteria lisogénica ya hemos dicho que no libera partículas infecciosas; esto implica o que la bacteria no contiene fagos, o que las propiedades infectivas del fago están enmascaradas. ¿Puede la inducción corresponder a un desenmascaramiento, y la lisogenia a la duplicación de una parícula fago enmascarada? Las partículas fago, como tales, ya sabemos que no sufren la fisión binaria. Cuando el fago es producido, la bacteria está siempre destinada a sufrir la lisis. Parece razonable la

conclusión de que la bacteria lisogénica no pueda perpetuar una partícula fago en estado de latencia, o enmascarada; la producción del fago, del profago, aparece por ello no como un desenmascaramiento, sino como algo de crecimiento (trabajos de Lwoff, Siminovitch y Kjeldgaard, 151). Parece razonable suponer que en una bacteria lisogénica inducida, como en una bacteria infectada, el desarrollo del fago proceda de un similar, aunque no idéntico tipo de material. ¿Qué material puede ser éste? Nosotros no conocemos proteína alguna dotada de continuidad genética, mientras que es sabido que el ácido nucleico específico puede ser base de dicha continuidad; por ejemplo, el bien conocido principio transformante de la bacteria, que parece ser va vinculado al ácido desosiribonucleico, y, por otra parte, los trabajos de Hershey y Chasse (35) demuestran que el fago T2 puede ser reproducido de su ácido nucleico con semejantes funciones, como único agente de su continuidad genética. Los cromosomas han sido comparados a macromoléculas de ácido nucleico, situados sobre fibros-histona, emergiendo la idea de que el ácido nucleico sea el responsable de la especificidad de los genes. El profago podría ser, pues, considerado como una macromolécula de ácido nucleico. Por otra parte, el ácido nucleico está exento de propiedades antigénicas; por ello, en la bacteria lisogénica, si el profago fuera únicamente ácido nucleico, estaría exento de antígeno fago. Los esfuerzos realizados por Lanni (152) para descubrir antígeno fago en la Sh. lisogénica disentería (P2) utilizando las vibraciones sónicas, parecen demostrar que la bacteria lisogénica (P2) no contiene equivalente serológico del suero bloqueante de la protección del tallo del fago maduro P2. Podría ser concluído, por ello, que esta específica proteína, es sintetizada únicamente cuando la bacteria lisogénica produce fago.

El profago puede ser citoplásmico o nuclear. Si es citoplásmico puede estar libre en el endoplasma, en forma similar a otras partículas citoplásmicas, o unido a plasmognes bacterianos específicos equipados, con continuidad genética. La lisogenia, salvo raras excepciones, es regularmente transmitida a su célula hija. Por otra parte, cada bacteria lisogénica posee un pequeño número de profagos, que se reproducen en armonía con la multiplicación bacteriana. Esto no supone que el profago es nuclear; él podía estar asociado con alguna estructura presente en los cuerpos polares, y su reproducción coordinada con la duplicación de estas estructuras, las cuales están combinadas a su vez con la multiplicación bacteriana.

Los trabajos de Lederberg (153) son, respecto a este punto, del má-

ximo interés. Fué el primero que ha hecho la observación de la transmisión de la lisogenia en experimento de recombinación. La raza original en la cual llevó a cabo sus trabajos la denomina K_{12} y es lisogénica; esta cepa, así como la mayor parte de los mutantes obtenidos de ella, produce un fago moderado λ. El comportamiento del carácter lisogénico ha sido estudiado también y en forma independiente por E. Wolmann (154), alcanzando la misma general conclusión. Comprueban los hechos siguientes: el cruce entre dos gérmenes lisogénicos produce únicamente lisogénicos; el cruce entre no lisogénicos, produce únicamente no lisogénicos; cruce entre lisogénicos y no lisogénicos produce lisogénicos y no lisogénicos. Sus trabajos los lleva a cabo sobre dos tipos de razas: una lisógena, la W_1, y otra sensible, que denomina 112-12, y que ha sido generalmente utilizada como indicadora para el fago moderado λ. Los resultados del cruce entre la lisógena W_1 y la sensible 112-12 pueden ser así resumidos; las recombinantes aisladas unas son lisógenas y otras no; la mayoría de las recombinantes (94 por 100) son lisógenas; todos los recombinantes lisógenos, salvo raras excepciones, están en posesión del carácter galactosa+, de su progenitor lisógeno; los otros marcadores de este progenitor están menos frecuentemente asociados al carácter lisógeno. Todos los recombinantes no lisógenos tienen el carácter galactosa + de su progénitor no lisógeno. Por otra parte, E. y J. Lederberg (155) han cruzado diploides homozigotes lisogénicos + y galactosa + con un homozigote lisogénico —, galactosa —. La bacteria heterozigote diploide obtenida fué lisogénica + y galactosa +. Estos díplodes producen espontáneamente haploides, que son casi exclusivamente uno de los tipos progenitores: lisogénica +, galactosa + o lisogenia — galactosa —.

Desgraciadamente la naturaleza del proceso sexual en el coli K_{12} es todavía oscura; no se sabe si se realiza una fusión o si un progenitor abastece a su compañero únicamente limitada parte de su material genético. La interpretación es complicada por la existencia de una poralidad descubierta en el coli K_{12} por Hayes (156). Según este autor, algunas cepas se comportan en la recombinación como dador (F +) y otras como receptor (F —). Ambos progenitores contribuyen desigualmente a la genética constitución de los recombinantes que poseen esencialmente de la raza receptor. Por ejemplo, cuando el receptor es lisogénico y el dador no lisogénico, el 94 por 100 de los recombinantes son lisogénicos. Determinadas observaciones parecen probar que, aunque el carácter lisogénico λ y el galactosa + sean encontrados juntos, en algunos recombinantes la prueba defi-

nitiva de que ambos caracteres pueden ser transmitidos de un dador a un receptor no ha sido todavía dada. La existencia de una verdadera conexión genética entre el fago λ y un gene bacteriano debe ser considerada únicamente como probable.

Ahora bien: estas diferencias genéticas observadas en los cruces ¿están asociadas al profago? El profago, según Lwoff (156a), no es una partícula infecciosa, y en lo que conocemos de él se sabe que cuando se multiplica como tal, se conduce como una partícula normal y pierde dos de las características fundamentales de los virus: infecciosidad y patogenidad. El profago sería un virus en potencia, es decir, el germen de un virus, o también la fase no virus de un virus. Boyd (156b) lo ha denominado fago simbiótico, pero este calificativo no ha sido aceptado y se mantiene el de profago. Este, como el gene, es una estructura específica con continuidad genética, como ya repetidamente hemos dicho. El está localizado en un lugar específico del cromosoma; se comportaría como si él fuera un trozo de cromosoma bacteriano, y, según esta hipótesis, la pérdida del profago sería algo comparable a una mutación génica. El profago es replicado en coordinación con la reproducción de la bacteria. Ya que durante el emparejamiento sináptico partes homólogas de los cromosomas son especialmente aparejadas, el germen del fago infectante puede estar específicamente ligado a una parte estructuralmente relacionada del cromosoma bacteriano. La presencia de esta estructura alélica podría ser una condición para la lisogenación.

Por lo dicho, resulta que todo el análisis del determinismo de la lisogenia depende fundamentalmente de la interpretación que demos al fenómeno de la recombinación genética. La hipótesis más sencilla sería la de una función bacteriana seguida de intercambio y segregación. La existencia de razas diploides heterozigotes ha venido a reforzar esta interpretación. Para otros, la recombinación es la consecuencia de una fusión, bien citoplásmica, bien nuclear, de los dos progenitores. Su participación desigual en la constitución de los recombinantes no sería más que un fenómeno secundario, pudiendo ser explicado sea por la eliminación ulterior de una parte del material genético procedente del progenitor F+, o por una contribución desigual de los núcleos, o de los cromosomas de las dos razas progenitoras (trabajos de Lederberg, Cavalli y E. M. Lederberg (157). Para Hayer (156), la participación desigual de los dos progenitores es un fenómeno primitivo y no secundario. Un recombinante está esencialmente constituído por el progenitor F —; la contribución del otro F +

sería limitada a una débil parte de su material genético, por lo cual el factor F + podría ser el rector. No hay pruebas en favor de la predeterminación de una bacteria dada a la lisogenación; la hipótesis más simple sería aquella que hace del profago mismo el determinante genético de la lisogenia. En resumen: nosotros podemos considerar a una bacteria lisogénica como en posesión en un determinado lugar del cromosoma de una estructura específica similar al gene, y su multiplicación estaría coordinada con la reproducción bacteriana. Esta estructura, el profago, es el material básico de la continuidad genética del fago en potencia. La lisogenia puede ser interpretada como la perpetuación hereditaria del genon del fago, integrado con el genon de la bacteria.

3. *La inducción*

La proporción de bacterias lisogénicas que producen fago espontáneamente es muy variable. La observación de Lwoff y Gutmann (18) de un número de microclones bacterianos del bacilo megatherium desarrollados en microgotas, comprueba en algunos clones una alta proporción de bacterias lisadas y fagos liberados, mientras que en otros únicamente una bacteria entre 100 ó 200 produce fago. Esto sugiere la idea de que la producción de fago es controlada por factores externos. Un estudio de la kinética producción del fago durante la evolución de los cultivos bacterianos, revela que las curvas de producción de fago y crecimiento bacteriano no van siempre paralelas. Repentinamente, un considerable aumento de fago se presenta en ciertos períodos de desarrollo del cultivo, lo que hace pensar que la producción del fago es controlada por algunos cambios del medio inducidos por el metabolismo bacteriano. Por otra parte, en las bacterias lisógenas, ciertas son inducibles, y otras no. Entre las no inducibles, la proporción de bacterias produciendo fago no puede ser modificada. El desarrollo del profago en fago depende de algo raro, espontáneo, que escapa a la experimentación. En las bacterias inducibles, la expresión del carácter potencial, la producción del fago, puede ser provocada a voluntad. Estudiemos los agentes inductores.

A) *Agentes inductores*

a) *Agentes físicos.*—Lwoff, Siminovitch y Kjeldgaardt (151) han obtenido la inducción utilizando los rayos UV, cuya energía estaba represen-

tada por la longitud de onda 2.537 A. Los rayos H (longitud de onda media 0,95 Å) son igualmente inductores.

b) *Agentes químicos.*—Lwoff y Siminovitch (158) utilizan como inductores químicos para el desarrollo del profago en el B. megatherium, determinadas sustancias reductoras, como el ácido L-ascórbico, el thiomálico, el thioglycocólico, revelándose que éstas sustancias no actúan más que en ciertos tipos de medios, llamados activos. La sustancia de los medios activos necesaria para que se manifieste la acción inductora de los reductores fué identificada por Lwoff (159) con el cobre. Tanto el ion cobre solo como los reductores sin cobre, son inactivos. La mezcla de los dos es inductor. La acción inductora de la mezcla reductora más Cu podría ser debida a la producción de agua oxigenada. Efectivamente, la catalasa suprime el efecto inductor de la mezcla reductor + Cu; en segundo lugar, el agua oxigenada añadida a un medio orgánico es inductora, es decir, desencadena la formación de fago en el bacilo megatherium. El agua oxigenada no es inductora más que en los medios sintéticos. Estos resultados están en armonía con los de Wyss y colaboradores (159), relativos a la acción mutágena de los peróxidos sobre las bacterias; el agua oxigenada añadida a un medio sintético no es mutágena, mientras que una mezcla de agua oxigenada y de ácidos aminados, de aldehido fórmico o de acetona, es mutágena. Lwoff y Jacob (160) han demostrado que otros agentes mutágenos, peróxidos orgánicos, epoxydos, etileneiminas, son igualmente inductores. Se hace notar que los inductores del desarrollo del profago pueden provocar mutaciones en las bacterias, en el neurospora y la drosofila, así como rupturas cromosómicas en las plantas. Es interesante advertir que numerosos agentes mutágenos son, a su vez, carcinógenos. Los trabajos del «Chester Beatie Institute» han sido objeto de una puesta al día por Boyland (161). La única sustancia mutágena y carcinógena hidrosoluble que no muestra acción inductora es el etilmetano. Por tanto, no todos los agentes mutágenos y cancerígenos son inductores del desarrollo del profago; pero todos los agentes físicos y sustancias ensayadas que inducen al desarrollo del profago o la síntesis de las colicinas, son mutágenas y cancerígenas.

B) *Factores genéticos que controlan la inductibilidad*

La inductibilidad ¿está ligada a una propiedad del profago o de las bacterias? Las experiencias de Ionesco (162) sobre el profago (1+) y (2—)

del megatherium permiten responder a esta pregunta. El profago (×) es inductible en las razas 899(1+), M(1+) y 17(2—) (1+). El profago (2—) no es inductible ni en la 17(2—), ni en la M(2—). La inductibilidad es en este caso manifestación ligada a las propiedades hereditarias del profago e independiente de la cepa bacteriana. El mismo fenómeno ha sido encontrado por Jacob (55b) en el Pseudomonas pyocyanea. El profago (1—) no es inductible, cualquiera que sea la raza bacteriana lisógena que le perpetúa. El profago (8+) es inductible. La irradiación del Pseudomonas pyocyanea (8+) (1—) acarrea la producción del solo fago (8+). Por otra parte, Lwoff (163) estudia una cepa del bacilo megatherium: la 899 (1+), que produce durante los años 1948 a 1951 fagos que dan únicamente grandes placas sobre la raza M. En octubre de 1951 hacen su aparición pequeñas placas. Los fagos (1g+) y (1p+) han sido aislados, y se han obtenido cuatro tipos lisógenos inductibles: Mox(1g+) y M(1g+), que dan únicamente grandes placas, y Mox(1p+) y M(1p+, que dan solamente pequeñas placas. Después de algunas semanas, la raza Mox(1p+) se volvió no inductible, o sea Mox(1p—). En nuevo fago (1p—), lisaba la cepa M(1p+). Todo sucedía como si una cierta proporción de bacterias M(1p+), produjera un nuevo fago(1p—), capaz de reproducirse en M(1p+). El nuevo fago no podía ser más que una mutante del fago original (1p+). Poco después, la raza originalmente M(1p+) se mostraba como su congénere Mox. únicamente constituída por gérmenes (1p—). Las dos razas Mox(1p+) y M(1p+), inductibles eran pues transformadas en no inductibles, en algunas semanas de intervalo. El progeso inductible p+ había pues aparentemente desaparecido (*). De todo ello, lo que nos interesa hacer resaltar, es el hecho de que un profago puede pasar del estado inductible al no inductible. Sin embargo, la inductibilidad no está únicamente ligada a una propiedad del profago. Así, lisogenado el coli C por fagos moderados λ, producido por la raza lisógena inductible E. coli $K_{12}(\lambda+)$, se obtienen razas lisógenas, las cuales algunas son inductibles y otras no lo son. Parece, pues, que según los casos, la inductibilidad, sea una propiedad, o bien de profago, o bien del sistema lisógeno. Ello podría depender entonces, de la forma en que se establece el equilibrio entre el profago y la bacteria huésped.

(*) Los profogos inductibles llevan el signo +, los no inductibles el signo —.

C) *Factores fisiológicos que controlan la inductibilidad*

La irradiación de gérmenes inductibles, no es necesariamente seguida por el desarrollo de fagos. Los efectos inductores de los UV, dependen en efecto no solamente de la naturaleza del profago, sino también del estado fisiológico del germen. La propiedad de reaccionar a los agentes inductores para el desarrollo del bacteriófago se ha denominado aptitud. Lwoff, Siminovitch y Kjeldgaard (151) y Lwoff (164), han comprobado que la eficacia de una determinada dosis de UV depende del estado fisiológico de la bacteria. Bacilo megatherium cultivado en medio sintético, no es inducido más que por dosis de UV mucho más elevadas que la que es necesaria para inducir las bacterias en medio levurado. Una bacteria será calificada de apta o inapta, según que se encuentre o no en estado que le permita producir fagos después de la acción de un agente inductor. La forma más simple de disminuir o suprimir la aptitud, es someter las bacterias a una carencia prolongada, así la carencia de glucídico en el megatherium (Lwoff, 164) o la de methionina en los mutantes deficientes del coli K_{12} (Borek, 165). Jacob (166), somete el P. pyocyanea a un ayuno glucosado de doce horas, y observa que es incapaz, después de la adición de glucosa, de comenzar un crecimiento exponencial; hay una fase de latencia de unos 40'. Las bacterias carenciadas tienen una aptitud muy reducida. Esta se encontrará restaurada en el momento en que las bacterias, 40' después de agregada la glucosa, pueden de nuevo crecer en forma manifiesta. Las dos principales modificaciones aportadas por el ayuno, son una disminución del número de bacterias inducidas por una dosis dada de UV y una disminución de la sensibilidad de las bacterias restantes inductibles. Estos dos efectos representan, por lo demás, expresiones diferentes de un mismo fenómeno. Pero si algunas bacterias lisógenas son irradiadas, después de sometidas a una determinada carencia, producen fagos, pero siempre, naturalmente, que previamente se les añada la sustancia de que carecen: esto, es verdad, para el p. pyocyanea carenciado en glucosa, y para el E. coli K_{12}, carenciado en methionina. La carencia en este caso no suprime el efecto del agente inductor; ella impide simplemente el desarrollo del profago inducido. Este desarrollo se produce en cuanto el metabolito que falta es añadido a la bacteria.

D) *La inducción de fagos con carácter de desarrollo abortivo*

El desarrollo abortivo del fago, no es más que un signo fatal de biosíntesis. El bacilo megatherium (1) puede ser lisogenizado con fago 1. Muchas de las razas se comportan como la original; 10^{-2} a 10^{-3} bacterias producen fago espontáneamente. Después de la inducción, toda bacteria lisogénica produce bacteriófago y lisa. Pero una de las razas lisogénica, la 9 (1), se comporta en forma diferente. Cultivos en crecimiento, un fago es encontrado por cada 1.000 bacterias; si una bacteria libera 100 fagos, esto significa que únicamente una bacteria de 10^5 produce fago espontáneamente; la anormal conducta de la raza 91 (1) del megatherium estudiada por Lwoff y Siminovitch (158), puede ser debida a una anormalidad de la bacteria o del profago, o a una anormal interacción del profago y la bacteria. El fago producido espontáneamente por la raza 91 (1) es normal, y toda la bacteria lisogenada con este fago produce fago después de la inducción. Es, pues, posible que la anormalidad de la raza 91 (1) esté ligada a una anormalidad en el enlace cromosoma-profago. Según estos autores, la lisis de la raza 91 (1), después de la irradiación, es debida a un desarrollo abortivo del profago. Dos problemas se derivan: uno, la raza 91 (1) ¿produce un fago, que no somos capaces de identificar? ¿Por qué es de desarrollo abortivo? El microscopio electrónico demuestra que no hay tal fago. En relación a la segunda pregunta, la estimación del ácido DNA durante el período de lactancia, nos dice que durante la primera mitad de este período no hay aumento de DNA; que en la segunda mitad, la síntesis del DNA es más deficiente, si la comparamos con la síntesis de una raza normal lisogénica durante el mismo período. Esto les lleva a la conclusión de que el desarrollo abortivo del fago en el bacilo megatherium 91 (1), deriva de un defecto en la síntesis del DNA. La conducta de esta raza 91 (1), nos suministra una ligazón entre la acción letal debida al desarrollo de un fago y la producción de colicina.

E) *Respuesta bacteriana a la inducción*

En una bacteria inducida, el profago evoluciona a fago y la bacteria es lisada. Bloqueemos el desarrollo del profago: en ese caso, o la bacteria

sufre una lesión irreversible y no dará descendientes, o la bacteria sobrevive, es decir, dará nacimiento a una colonia. Si la p. pyocyanea inducida, es sometida a una radiación visible, y durante un tiempo variable se comprueba que un 80 por 100 de la bacteria tratada, inmediatamente después del choque inductor no da centros infecciosos, y una gran proporción da nacimiento a una colonia (trabajos de Jacob, 166). Todos los clones son lisógenos. La reversión puede ser obtenida hasta los 20', la duración de la fase de latencia en las condiciones en que las experiencias fueron realizadas era de 45'. Se puede, pues, someter p. pyocyanea en medio sintético a determinada dosis de UV. La siembra sobre una placa de gelosa después de 50' revelará que más del 90 por 100 de las bacterias han sido inducidas y producen fago. Pero si la siembra sobre la raza sensible es hecha inmediatamente después de la irradiación, la proporción de bacterias que dan fago no es más que del 20 al 30 por 100. La producción del fago ha sido detenida en un 60 por 100 de los gérmenes. La siembra sobre gelosa sin raza indicadora inmediatamente después de la irradiación, permite comprobar que la mitad de las bacterias que abandonadas en medio sintético habían sido lisadas, dan colonias. Estas colonias están constituídas por gérmenes lisógenos. La reversión por extensión sobre gelosa ha sido observada no solamente en el p. pyocyanea, sino también en el coli K_{12}, por Weigle y Delbruck (55a) y por Lwoff en el megatherium (164); en este germen un cambio de medio, por ejemplo el paso del caldo al medio levurado, suprime el efecto de la inducción. Huysbers (167) comprueba que en el b. megatherium (1+) inducido, el desarrollo del fago puede ser detenido por la adición de iones Cu++ y Zn++. Las bacterias sobreviven. Los efectos de los iones cobalto, cobre y zinc son suprimidos por el manganeso. La carencia en manganeso provocada por los iones competidores, impide, pues, el desarrollo del profago y suprime el efecto de la inducción. Puesto que la bacteria inducida y revertida, queda lisógena, esto quiere decir que el profago inducido y que ha comenzado a desarrollarse, es vuelto al estado de profago. Es posible que los inductores provoquen una modificación bacteriana necesaria al desarrollo del profago, siendo esta modificación la que ha sido revertida. Por lo tanto, para que una bacteria lisógena produzca fagos después de la irradiación con UV, se precisa que el profago sea inductible y que las bacterias sean situadas después de la inducción en condiciones que permitan el desarrollo del fago, es decir, que las bacterias

estén en un estado fisiológico determinado, llamado aptitud, y que no sean las bacterias sometidas a acciones de restauración, como la luz visible, extensión sobre gelosa, etc.

F) *Acción de los inductores*

a) *Acción química y biológica.*—Los recientes trabajos de Buttler, Press y James (168), han demostrado que la hiperita nitrogenada rompe los enlaces hidrogenados entre los grupos aminados libre y grupos oxidroxilos de las bases púricas y pirimídicas contiguas,, de la molécula del a. nucléico, enlaces responsables de la rigidez de la molécula. Bajo la influencia de los rayos X, el ácido DNA sufre modificaciones análogas. Se sabe también que determinados mutágenos pueden provocar rupturas cromosómicas. En ausencia de todo dato sobre la base estructural de la especificidad del gene, el mecanismo de la mutación, y entendido también el del modo de acción de los mutágenos, se nos escapa completamente; tengamos sin embargo presente que una mutación genética específica es un acontecimiento relativamente raro. Esta escasa probabilidad se explica si una mutación dada está ligada a un cambio arquitectural específico, tal que una modificación definida en la ordenación de una cadena de moléculas de nucleótidos púricos o pirimídicos.

La inducción del desarrollo del fago se presenta cualitativamente de una forma bastante diferente de la inducción de una mutación, como más adelante hemos de examinar.

b) *Relaciones entre el desarrollo inducido y espontáneo del profago.*—La transformación del profago en fago en una bacteria lisógena, bien sea espontánea o inducida, podría derivar de dos tipos de mecanismo: o por una modificación del profago, o por una modificación de la bacteria. El estudio de la raza lisógena p. pyocyanea 13, realizado por Jacob (55b), perpetuando dos profagos 8 y 4, prueban que se desarrollan simultáneamente. Examinemos lo que pasa después de la inducción. Las dosis débiles de UV, inducen en general al desarrollo de un solo tipo de fago 4 u 8: las dosis fuertes inducen al desarrollo de los dos fagos 4 y 8. Se puede demostrar que cada uno de los dos profagos es inducido independientemente uno del otro.

El estudio de la producción espontánea del fago, nos ha suministrado datos muy útiles. En la denominada raza 13 (8,4), una bacteria sobre 600 libera espontáneamente fagos. En medio de las bacterias productoras de fago, el 50 por 100 dan exclusivamente fago 4; 25 a 30 por 100 dan fago 8; 20 a 25 por 100 dan a la vez fago 4 y 8. Las causas primarias de la producción espontánea, pueden ser, o bien una mutación del profago, o una modificación de la bacteria. La primera no está al parecer de acuerdo con los datos experimentales. Ello implica, en efecto, una independencia absoluta en la producción de cada uno de los fagos, o la probabilidad para una bacteria de producir espontáneamente los dos fagos debería ser inferior a 10^{-6}, mientras que los valores encontrados son del orden de 5.10^{-4}. Jacob (55b), descarta en forma definitiva la hipótesis de la mutación del profago. Nos queda la segunda hipótesis, una modificación bacteriana. Se sabe que determinadas substancias son capaces de inducir la producción de fagos sobre las bacterias lisógenas. Es posible, pues, que en un pequeño número de bacterias, un cambio provocado, bien por mutación génica, bien por una perturbación fenotípica del metabolismo, provoque la aparición de una substancia inductora, por ejemplo un peróxido orgánico. Esta substancia podría aparecer en mayor o menor cantidad, la cual provocaría el desarrollo, bien de los dos fagos o de uno solo. Si esta conclusión es exacta, deberá existir una relación entre la frecuencia de la producción espontánea del fago, y la inductibilidad de las cepas. Esto es lo que parece ser cierto para las razas del p. pyocyanea estudiadas por Jacob (55b). Esta relación será aún más acusada, entre sistemas inductibles y no inductibles. En la p. pyocyanea, la frecuencia de la producción espontánea para las razas no inductibles, es mucho más débil que para las inductibles. Con la raza 13, la probabilidad para una bacteria por ciclo de división, de producir el fago inductible 8+ es alrededor de 10^{-3}, mientras que la probabilidad de producir fago no inductible, es del orden de 10^{-5}; todo esto parece indicar como si los sistemas no inductibles exigieran para producir fago algunas modificaciones distintas, y cuya rareza evocan la de las mutaciones bacterianas.

c) *El mecanismo de acción de los inductores.*—Ahora bien, la inductibilidad es principalmente controlada por la constitución genética del profago, pero los efectos de una determinada dosis de un agente inductivo, varían con el estado fisiológico de la bacteria antes de la irra-

diación, y el último efecto de esa dosis que actúa sobre el germen puede ser modificado por varios factores; por todo ello, su modo de actuar no es bien comprendido, y como consecuencia a la falta de conocimiento en relación a la naturaleza de las fases iniciales en el desarrollo del fago, la situación está lejos de ser simple y clara. En tanto el profago se mantenga profago, él es incapaz de evolucionar a fago. Por lo cual, para que una bacteria lisogénica pueda ser conducida a producir fago, se precisa que el profago pierda su naturaleza de tal y se convierta en gonofago, que es la forma genética del fago durante su fase vegetativa.

Jacob (55b), ha emitido dos tipos de hipótesis en relación al mecanismo de la inducción: la primera, dice que los rayos UV actuarían sobre el profago, sea directamente, sea indirectamente por intermedio de una substancia mediadora producida en la bacteria. El profago es el blanco para los rayos o las moléculas del mediador. El efecto primario sería heterogéneo. En el caso del p. pyocyanea 13 (8+ 3+), el desarrollo de cada uno de los profagos sería inducido independientemente uno del otro. Los inductores podrían provocar un cambio del profago, que les haría pasar de un estado inactivo I a un estado activo A. Debemos tener en cuenta, primero, que hay en las bacterias lisógenas identidad de las propiedades del fago original y de los secundarios, los cuales, verosímilmente, perpetúan una estructura específica; segundo, que los inductores desencadenan el desarrollo del profago en la casi totalidad de los gérmenes; tercero, que la inducción es reversible. Se debe admitir que el estado I es inestable y que la reacción $I \Longleftrightarrow A$ es reversible. Se puede, pues, esbozar la hipótesis de que los inductores provocan la ruptura de una ligazón fácil del profago con el cromosoma bacteriano. El estado inactivo I correspondería al profago fijado sobre el cromosoma; el activo A al profago libre. La reducción del fago infectante en profago, correspondería a la fijación sobre un cromosoma. Por otra parte, es sabido que las partes homogéneas de dos cromosomas pueden atraerse. La fijación del profago sobre el cromosoma, podría ser la consecuencia de una analogía de estructura entre el material infectante del fago y un sector definido de un cromosoma bacteriano. Los agentes inductores o reversores, harían inclinar en un sentido o en otro el equilibrio de una reacción, de donde dependería la afinidad del profago para el cromosoma. En esta hipótesis, la inductibilidad sería función de la labilidad de la unión del profago con el cro-

mosoma, y podría depender también del hecho de que el profago esté situado o no en una extremidad del cromosoma. Toda concepción relativa al mecanismo de la inducción, debe poder explicarnos el problema de la inmunidad de las bacterias lisógenas frente a los fagos homólogos o no. En efecto, en una bacteria lisógena, no solamente el profago, sino también los fagos infectantes homólogos, son incapaces de desarrollarse. Todo sucede como si la presencia de la estructura profago, impidiera una reacción necesaria a su desarrollo. En la hipótesis que discutimos, el profago bloquearía la reacción en cuestión, por el hecho de su presencia sobre el cromosoma, en virtud de efecto de posición.

En la hipótesis segunda, Jacob (55b), asegura que los rayos UV, actuarían sobre las bacterias modificando el equilibrio de determinadas reacciones. El desarrollo del profago, no será más que un acontecimiento secundario. Dos mecanismos pueden ser tomados en consideración: por una parte, se sabe que fago contiene una o varias proteínas antigénicas particulares, que no existen en las bacterias normales. También se sabe que las bacterias productoras de colicininas no inducidas, no contienen colicidina. La inducción presupone, pues, la síntesis de nuevas proteínas, y para ello ha sido considerado que la formación de estas proteínas sería debido a la intervención de substancias producidas a consecuencia de la acción de los inductores, y jugando frente al profago o al gene-colicina el papel de substancias inductrices en la biosíntesis inducida de los enzimas. Por otra parte, se hace intervenir también un equilibrio dinámico. Se admite que los diversos elementos bacterianos sensibles a la acción de UV (ac. nucléico, por ejemplo), son lo contrario que el profago relativamente independiente. Toda acción de los inductores ejerce una acción perturbadora general del metabolismo a favor de la cual el profago comenzaría su desarrollo.

El blanco bacteriano sería mucho más voluminoso que el profago, y por ello se concibe que la probabilidad de inducción sea mucho más considerable que la probabilidad de destruir el profago. El problema del mecanismo por el cual los agentes mutágenos y cancerígenos desencadenan el desarrollo del profago en fago, está, como puede observarse, lejos de su aclaración. Lwof (152) considera el profago como una estructura específica anclada en un determinado lugar del cromosoma,

capaz de desarrollarse y entrar en la fase vegetativa, únicamente si él se desprende de su anclaje, y este desprenderse podía ser el efecto del agente inductible.

4. *La reacción lisogénica.*

A) *Su control genético*

Como es ya conocido, el fago moderado produce placas turbias que, a su vez, pueden dar lugar a mutantes productoras de placas claras. Este tipo de mutantes ha sido encontrado por Boyd (16) en la S. typhimurium, por Burnet y Lush (11) en el micrococus, y por Murphy (170) en el bacilo megatherium. Un fago A_1 produciendo placas turbias sobre la raza indicadora de S. typhi-murium, forma mutantes Ac, que producen placas claras. Ahora bien: la respuesta lisogénica de una bacteria después de la constitución genética del fago, y a su vez de las propiedades fenotípicas de la bacteria, es controlado por la constitución genética de la bacteria.

Cuando en un determinado medio un fago es conducido a actuar sobre dos diferentes razas bacterianas, el resultado puede ser completamente distinto. Un fago de bacilo megatherium produce placas turbias sobre determinada cepa, pero clara sobre otras. Aquí, la reacción de la bacteria a un determinado fago parece estar controlada por la constitución genética bacteriana. El problema de la lisogenación es complicado por el factor de que la respuesta bacteriana no depende únicamente de la constitución genética del fago y de la bacteria, sino de la interrelación e interacción de sus materiales genéticos. Así, la respuesta bacteriana a un fago moderado está bajo el triple control de la constitución genética del fago y de la fenotipia y constitución genética de la bacteria. Cuando estudiamos la respuesta a una dada población bacteriana, a un determinado fago, se tiene la impresión de que ella está controlada por factores ambientales. Pero todas sus características están, en último análisis, controladas por la constitución genética de la bacteria.

B) *Factores no genéticos*

Bertani (171), recientemente, ha abordado el problema de los factores que controlan la reacción lisogénica de una bacteria. Según este autor, el

futuro de la Sh. disentérica infectada por un fago moderado Pl depende particularmente de la temperatura. La proporción de bacterias infectadas produciendo fagos es de cuatro a cinco veces más alta a 37° que a 25°. Estas experiencias prueban que la respuesta bacteriana no depende exclusivamente de la constitución genética de la bacteria o del fago. Esto ha sido establecido por Lieb (172), al cual somos deudores de un extenso trabajo sobre el sistema E. coli K_{12} + fago λ. Todos los tipos de reacciones bacterianas son encontrados cuando el fago λ es añadido al E. coli K_{12}. La proporción de bacterias receptivas varía según el fago que se desarrolla en el caldo, indicando que la modificación como consecuencia del metabolismo microbiano induce a cambios en las características de las bacterias; viejas bacterias absorben mejor el fago que las jóvenes. El poder de absorción de una bacteria dada no es modificado por la suspensión en un viejo o joven medio. La diferencia entre viejas y jóvenes bacterias no es absoluta. Por otra parte, la proporción de descendientes lisogénicos de una sola bacteria infectada varía con la temperatura. Es más alta a 25° que a 37°. Un E. coli K_{12} (λ) no puede ser curado de su lisogenia a 45°; el profago no es afectado por las altas temperaturas. Según los experimentos de Lieb (172), el futuro del fago infectante o de su material genético es decidido en el momento de la infección; puede depender de las propiedades de los receptores bacterianos. El futuro del profago puede quedar protoplasmático durante una hora a 37°; incapaz de duplicarse, al dividirse la bacteria, el número de ellas descendientes, poseen al menos una partícula, y ello ha de depender del inicial número de partículas, de la división bacteriana, de la proporción de conversión de la partícula en próíago. Según la interpretación de Lieb, el paso final de la reducción es la unión a una estructura bacteriana regularmente heredada, con localización en un cromosoma. Por tanto, el futuro del profago es una estructura protoplasmática, incapaz de dividirse, conduciéndose durante la división celular como una partícula inerte. Su presencia le confiere inmunidad.

C) *Influencia de la multiplicidad*

Boyd (169) descubrió en 1951 que el S. typhi-murium se conduce en forma diferente hacia un fago A, según la multiplicidad de la infección. No hay lisis visible cuando la proporción fago bacteria es 10, mientras

que hay visible lisis cuando esta proporción es 1. Cuando la raza detectora es sembrada con exceso de fago, el 72 por 100 de la inicial bacteria puede ser recuperada como colonia lisogénica, porque la población del fago A contiene dos tipos de fago. Boyd (169) ha propuesto una nueva interpretación de la lisogenia, según la cual el paso del profago al fago es la consecuencia de una mutación. Así, dos tipos de fago pueden ser producidos siendo únicamente uno de tipo moderado. En el presente, una influencia de multiplicidad sobre la lisogenación ha sido observada únicamente con el fago A del typhimurium y parece ser una rara propiedad. Actualmente el carácter multiplicidad puede malograrse como resultado de una mutación del fago. Como sabemos, el porcentaje de reacciones lisogénicas de la bacteria es controlado por la composición del medio en que ellas se desarrollan.

Varias sustancias (ácidos láctico, pirúvico, fumárico, cítrico, etc.), añadidas al caldo, disminuyen la proporción de respuestas lisogénicas. Otros factores, como la anaerobiosis, que altera el metabolismo, producen los mismos efectos. Según Lwoff y Jacob (160), si las bacterias son irradiadas con luz UV, antes de la infección, el porcentaje de respuestas productivas es considerablemente aumentado. De los trabajos de Lwoff y Jacob (160) puede deducirse que la lisogenación está ligada a un mucho más delicado balance que la reacción germen-gonofago.

Así, pues, el futuro de la S. typhimurium parece depender de si una u otra reacción germen-gonofago o germen-profago puede tomar lugar primero. La conclusión de que el futuro de la bacteria no sigue inmediatamente a la penetración del fago es conformada por el hecho de que la bacteria infectada por la mutante Ac (placa clara) puede ser prevenida de producir fago Ac, si es simultáneamente infectada por fago A. Esto es aparentemente suficiente para llevar la reducción del fago A a profago, confiriendo inmunidad hacia el fago Ac. El período durante el cual la bacteria infectada puede ser conservada es aumentado por la cloromicetina.

La interpretación de estos hechos es difícil. Parece ser que el futuro del fago infectante es controlado por la probabilidad de que una determinada reacción tenga lugar. Puede suceder que solamente sea afectada una reacción, pero aun así su efecto será distinto según el estado del material fago en la bacteria en el momento de la reacción. Así, la lisogenización tendrá lugar únicamente si el germen está en la vecindad de un determinado lugar del cromosoma. Puede entonces ser comprendido

porque la probabilidad de lisogenización aumenta con la multiplicidad. La respuesta productiva o reductiva de una bacteria es determinada, pues, bajo ciertas condiciones, por la multiplicidad. Resumiendo lo anterior, podemos decir que la respuesta lisogénica de una bacteria hacia un fago es controlada por la continuación genética de la bacteria y del fago, por la interacción de estas estructuras genéticas, por los rasgos fenotípicos de la bacteria, por su metabolismo y, en ocasiones—caso del S. typhimurium—, por la multiplicidad de la infección.

5. *Incompatibilidad.*

Es bien sabido que algunas bacterias lisógenas pueden perpetuar un número de diferentes profagos; así, Smith (173) ha comprobado que algunos estafilococos pueden producir cinco tipos de fagos. Por otra parte, los fagos homólogos y algunos de sus mutantes pueden penetrar en el interior de la bacteria lisogénica sin matarla, y el material genético del fago infectante es capaz de sobrevivir, pero no se desarrolla. Bertani (171) ha estudiado el futuro de la Sh. disentérica después de la infección con varios mutantes de fago homólogo. Dobles razas lisogénicas pueden ser obtenidas; cada bacteria, al producir fagos, da ambos tipos en la proporción de 1/1. Muchas de las bacterias lisogénicas infectadas con una mutante continúan siendo lisogénicas para su portador original del profago. Pero en algunos se producen mutantes en lugar de su fago original; es decir, el primitivo ha sido reemplazado por una mutante. Así, pues, la sustitución de un profago por otro afín puede tener lugar; en general, la adición de un profago alejado a otro es excepcional. Esta incompatibilidad ha sido estudiada y definida por Bertani. Parece como si la reducción hacia el profago del germen de un fago infectivo es imposible en una bacteria lisogénica que porta un prófago homólogo o alejado.

Según Bertani, la más probable hipótesis es que cada bacteria lisogénica o quizá cada núcleo de una bacteria lisogénica porta únicamente un profago que se conduce como pieza del cromosoma bacteriano; la reducción tendría lugar solamente en un lugar específico del cromosoma bacteriano, diferente para cada fago. Si la posición está ocupada, la reducción no podría tener lugar. En esta concepción, un «locus» diferente del cromosoma bacteriano corresponde a cada fago estructuralmente distinto. Así, la bacteria doblemente lisogénica podría perpetuar los profagos entre

sí relacionados al ser diploide la bacteria o bacterias, teniendo duplicada la zona del cromosoma portadora del fago. Recordemos que los profagos afines pueden sufrir recombinación en doble bacteria lisogénica, conduciéndose como estructuras allélicas. Todos estos conceptos conducirían a la misma conclusión: el profago está localizado en una única estructura bacteriana específica, que puede aceptar o hacerse cargo de un único profago. Aparentemente, la reducción del fago en profago puede ocurrir únicamente en un único lugar del cromosoma, no ocupado por un profago afín. Es conocido por estudios de emparejamiento sináptico que las partes homólogas del cromosoma tienen una afinidad efectiva, que es claramente expresada en la inversión cromosomal.

6. *Pérdida de la lisogenia.*

Se hace referencia en algunos trabajos de cómo razas espontáneamente no lisogénicas se hacen lisogénicas, o razas que son lisogénicas pierden esta propiedad, que pueden volver a recuperar. Sabemos también cómo hay fagos moderados muy frágiles. Ellos son fácilmente absorbidos por filtros de porcelana o inactivados por cationes monovalentes en ausencia de cationes bivalentes. Ahora bien: dice Lwoff (152) que no se conoce ningún ejemplo de una bacteria no lisogénica que espontáneamente se ha hecho lisogénica. La raza no lisogénica mutilada del bacilo megatherium obtenida por Dooren de Jong (174), conservada todavía en muchos laboratorios, nunca ha recobrado su lisogenia, excepto por infección. La pérdida de la lisogenia fué obtenida experimentalmente por Dooren de Jong en el megatherium y en el bacilo undulatus en medio conteniendo 10 por 100 de peptona; razas asporógenas o mutiladas no lisogénicas eran de esa forma seleccionadas; habían perdido su inmunidad original hacia el fago homólogo. No parece existir ninguna correlación entre lisogenia y esporogenia. De tipos lisogénicos esporógenos de bacilo megatherium pueden ser obtenidos clones esporógenos no lisogénicos, y razas no esporógenas de megatherium pueden ser lisogenadas sin recuperación de su esporogénesis (trabajos de Lwoff-151).

Clarke (175) ha encontrado otro camino para la obtención de razas no lisogénicas. Si un bacilo megatherium lisogénico es subcultivado en un medio sintético conteniendo citrato, la lisogenidad era perdida después

de 61 subcultivos. Estos trabajos fueron confirmados por otros investigadores.

Ahora bien: ¿cómo se pierde la lisogenidad? Siendo el profago una partícula específica dotada de continuidad genética, la pérdida de la lisogenidad ha de significar la pérdida o alteración permanente del profago. Si el profago fuera una partícula citoplasmática, la pérdida de éste pudiera ser producida por una relativa disminución en la intensidad de multiplicación del profago en cierto medio. Como el profago parece estar ligado a un cromosoma bacteriano, la pérdida del profago puede ser considerada o como una mutación irreversible del profago, o como una pérdida de una porción del cromosoma bacteriano, o también como resultado de una ausencia accidental de la replicación del profago.

En medios donde los fagos son numerosos y donde la absorción es buena, la bacteria no lisogénica tiene una buena ocasión para ser reinfectada y por ello lisada o lisogenizada. Se ha sugerido también que la bacteria lisogénica puede ser curada de su lisogenia por fuerte irradiación con luz UV. Esto parece ser una buena técnica para la destrucción del profago. Hemos de reconocer que en el momento actual el íntimo mecanismo que nos explique el porqué de la pérdida de la lisogenidad no lo conocemos. Lo único cierto es que toda raza lisogénica estudiada que pierde su lisogenidad, pierde también su inmunidad.

7. *Inmunidad en lisogenia.*

Como ya Bail y Bordet habían comprobado, las bacterias lisogénicas no eran lisadas por su homólogo fago. La existencia de una relación entre lisogenia y resistencia modificada de la bacteria fué concebida en el 36 por Burnet y Lush (11); los cocos originalmente no lisogénicos eran receptivos, mientras que las razas lisogénicas no eran receptivas. Estos investigadores habían observado que el coco lisogénico SF era incapaz de absorber su homólogo fago. Ellos obtienen la conclusión, posteriormente confirmada, de que las bacterias lisogénicas no receptivas son capaces de producir fago. La variante rugosa de la S. typhimurium (raza lisogénica, incapaz de absorber el fago homólogo) puede producir y liberar fago (Lwoff y colaboradores, 151). Resulta atractiva la conclusión de que puedan ser producidos fagos por bacterias exentas de un receptor específico para la absorción del fago. Hoy se sabe cómo algunas bacterias no

receptivas pueden poseer el receptor específico en forma enmascarada (trabajos de Nicolle y colaboradores, 176).

Es, pues, difícil determinar si una bacteria no receptiva está completamente exenta de receptor fago específico, o de alguna parte de este receptor, o si un determinado fago puede ser producido en aquellos gérmenes que son incapaces de síntetizar el receptor del fago específico. Por otra parte, como ya sabemos, la bacteria lisogénica es capaz de absorber el fago homólogo, y también conocemos que el fago homólogo desaparece como unidad infecciosa en presencia de la bacteria lisogénica. Era creído que dicho fago homólogo no penetraba en la bacteria y que la resistencia de la bacteria lisogénica representaba algo completamente peculiar, que se denominó inmunidad. Pero Bertani (171) demostró la realidad de la penetración comprobando cómo un fago allegado puede sustituir al profago normal. Una segunda prueba de la penetración fué obtenida con el P. pyocyanea por Jacob. Después de la infección de una bacteria lisogénica con una mutante del fago homólogo, se encontraron que las partículas infectantes eran distribuídas en sus descendientes, que, finalmente, se perdían. Parece como si el material genético del fago infectante persiste en el protoplasma de la bacteria, pero es incapaz de sufrir replicación. Mientras que la reproducción del profago está relacionada con la de la bacteria, el germen no reducido del fago infectante es incapaz de repetición en una bacteria inmune lisogénica (trabajos de Jacob y Wollmann, 177).

La proporción de bacterias produciendo fago espontáneamente no es modificada por infección con la mutante del fago; cada bacteria produciendo fago suministra ambos, pero esto únicamente durante un corto período de tiempo después de la infección.

De los trabajos citados de Jacob y Wollmann (177) resulta que los fagos relacionados absorbidos por bacterias lisogénicas penetran en las bacterias, pero no se desarrollan. Las bacterias son muertas. Esta supervivencia, diferente de la supervivencia debida a la no receptibilidad, ha sido adscrita a un estado de inmunidad. Inmunidad es, pues, la propiedad de una bacteria lisogénica a sobrevivir a una infección por un fago homólogo o allegado. Por lo tanto, la inmunidad a la destrucción del fago infectante que puede sobrevivir en el protoplasma bacteriano por varias generaciones se refiere fundamentalmente al hecho de que dicho fago no se desarrolla. Pero cuando el profago se desarrolla, bien sea espontáneamente o por inducción extrínseca, el fago se desarrolla también. La inmunidad está, pues, ligada a la persistencia del profago como tal; pero la presencia de

éste no es responsable de la inmunidad, si bien ella es precisa para que una bacteria inmune pueda ser seleccionada.

El profago sería como una vacuna, ya que en un ambiente donde el fago encontrado únicamente en las bacterias inmunes puede sobrevivir, y porque las bacterias inmunes son seleccionadas solamente en presencia del fago, y en este caso el profago es preciso para prevenir epidemias. Sin duda que de cuando en cuando el profago pasa a fago, y algunas bacterias son muertas. Este es el precio que la población bacteriana tiene que pagar para su sostenimiento. Parece ser, pues, que en la bacteria lisogénica una reacción que controla el desarrollo del profago y del fago homólogo y allegado es bloqueada. ¿Hasta dónde se extiende esta inmunidad específica? Así, un fago 1 puede dar placas sobre una bacteria lisogénica B (2), mientras que otro 2 no produce placas sobre B (1). La conclusión es que el fago 1 inmuniza frente al fago 2, mientras que el profago 2 no inmuniza al fago 1.

Jacob (171) comprueba que si el P. pyocyanea es infectado simultáneamente con fagos 4 y 8, ambos fagos se desarrollan, no hay exclusión. Aunque el fago 4 da placas sobre el P. pyocyanea, mientras que el 8 no las da, esta ausencia de placas no sería debida a una inmunidad. El estudio del futuro individual del P. pyocyanea infectado con fago 8 hace observar que del 2 al 5 por 100 de las bacterias infectadas producen fago 8, y que el 50 al 60 por 100 son muertas, mientras que el 40 por 100 sobreviven. Se puede decir que en la lisogénica P. pyocyanea las reacciones hacia el fago 8 son modificadas por la presencia del profago 4. Las bacterias son alérgicas, paro no inmunes, ya que la ausencia, en este caso, de placas no es debida a la inmunidad bacteriana. Es de suponer que si un profago A inmuniza frente a uno B, el profago B inmunizará frente al A. En otras palabras: la inmunidad es específica, o al menos específica de grupo. Así, en lo que conocemos en las bacterias lisogénicas, el proceso responsable para la inmunidad es controlado por el profago. Es posible que uno de los primeros pasos del desarrollo del fago infectante implique emparejamiento con una sección homóloga del cromosoma bacteriano. La presencia en este lugar del profago podría ser concebido como un preventivo del inicial emparejamiento.

En ocasiones hay ausencia de inmunidad. Jacob, Wollmann (L.) y Siminovitch (178) comprueban que el bacteriófago $\lambda +$ del E. coli produce espontáneamente dos tipos de mutantes: λc y λv. El original $\lambda +$ es un tipo moderado que produce placas turbias sobre su raza

indicadora K12S; la mutante λ c da placas claras sobre K12S, pero ninguna sobre la lisogénica K12(λ+). Las bacterias resistentes son raras, y todas las que fueron ensayadas eran receptivas y no lisogénicas. La mutante λ v se comporta en forma distinta a la λ c; produce placas sobre K12(λ+), no siendo, por lo tanto, inmune. ¿Cuál es la razón para esta clase de inmunidad? El experimento de estos investigadores hace observar: que la infección del E. coli K12(λ+) con fago virulento λ v induce al desarrollo del profago λ +; que el λ v inactivado con luz UV puede ser recuperado; que la recombinación entre λ v y λ+ puede producirse; que el fago λ v, en que el carácter v ha sido destruído por la luz UV, es todavía capaz de acción inductiva. Ciertamente existe una relación entre la inducción, recuperación y recombinación. Las consecuencias de este fenómeno pueden ser, en muchos casos, inducción, recuperación, multiplicación y recombinación. El fago λ v no induce al desarrollo del fago en el coli lisogénico portador de varios profagos no afines al λ. Como fago λ v induce solamente al desarrollo de los profagos relacionados, inducción que, en este caso, parece ser específica de grupo. Así, la ausencia de inmunidad del E. coli K12(λ+) frente al mutante virulento λ v podría estar ligada al hecho de que λ induce al desarrollo de profago λ+. Por otra parte, según Bertani (171), el fago de la Sh. disentérica produce tres tipos de mutantes virulentos: virulento débil, hacia el cual la raza lisogénica original es inmune; virulento moderado, que produce unas pocas placas, y virulento fuerte, que produce el mismo número de placas sobre las razas lisogénicas y sobre las no lisogénicas.

8. *Relaciones entre las bacterias lisogénicas y el bacteriófago.*

Las bacterias lisógenas perpetúan una partícula específica: el profago, cuya reproducción está coordinada con la de la bacteria. El profago está fijado en un determinado lugar del cromosoma bacteriano. El futuro, pues, del profago estará ligado al futuro de una integrada estructura bacteriana. El número de profagos por bacterias es bajo, y los experimentos parecen indicar que él es del mismo orden que el número de núcleos bacterianos, es decir, un profago por núcleo. En el caso estudiado, la lisogenia se comporta como un carácter unidad que parece estar localizado en un lugar definido del cromosoma bacteriano. La presencia de un profago impide la reducción en profago del material genético de los fagos

infectantes vecinos. El receptor cromosómico del profago parece ser una estructura específica única. La presencia del profago confiere a la bacteria lisógena inmunidad frente a los fagos homólogos o allegados. Estos, cuando penetran en la bacteria lisógena, se comportan como partículas inertes. Ellos no se reproducen ni se desarrollan; son diluídos en cada una de las divisiones bacterianas. Sin embargo, cuando el profago se desarrolla espontáneamente o a consecuencia de una inducción, el fago infectante se desarrolla igualmente.

El estudio comparativo del desarrollo espontáneo e inducido de los bacteriófagos en las razas polilisógenas ha conducido a la conclusión de que éstos actúan aumentando la probabilidad de un cambio cromosómico bacteriano. Para que una bacteria pueda hacerse lisogénica se precisa que el material genético del fago infectante sea unido a un específico receptor cromosómico. El profago aparece así no únicamente como una estructura específica, sino como una estructura específica localizada en un lugar específico. El profago no se desarrolla más que si él es separado del cromosoma. Las características, pues, del profago (la lisogenia, la inmunidad) serían la consecuencia, no simplemente de la presencia de una partícula específica, sino la presencia de una partícula específica sobre un receptor específico. El carácter moderado o virulento de un fago sería el reflejo de la homología estructural del material genético del fago y del cromosoma receptor. La bacteria lisogénica sobrevive únicamente si el profágo no se desarrolla dando lugar al fago. En la bacteria lisogénica el fago infectante homólogo o vecino es incapaz de desarrollarse. Esto es inmunidad. La inmunidad es, pues, un colorario de la lisogenia o del profago. Una bacteria lisogénica sólo puede perpetuarse si es inmune. De tiempo en tiempo ella expresa su potencialidad y produce fagos. El profago solamente se desarrolla si cesa la inmunidad, estando unida esta inmunidad a la presencia del profago; son, pues, inseparables profago e inmunidad. La inmunidad es, pues, un corolario de la lisogenia o del diferente del gonofago, material genético del fago durante la fase vegetativa de su ciclo. Todo esto explica que el fago se desarrolle cuando el profago, habiendo cesado de estar en estado de profago, pierde la inmunidad. Para que la fase vegetativa pueda iniciarse, se precisa que el material genético del fago se separe de su locus cromosomal. Los efectos inducientes de algunos fagos virulentos sobre profagos vecinos podían ser debidos a la separación del profago del cromosoma bacteriano. Por otra parte, la replicación del material genético de fagos infectantes no

puede efectuarse en bacterias lisogénicas inmunes por bloqueo de alguna reacción precisa para la replicación; pero la estructura profago no bloquea una reacción por la sola virtud de su presencia: lo hace al modificar la propiedad de alguna estructura, y, para que esto suceda, un lugar funcional llave ha de ser ocupado.

¿Cuál es la reacción bloqueada por el profago que controla la inmunidad? Ya hemos dicho que el emparejamiento del material genético del fago y del cromosoma bacteriano es un paso necesario para el desarrollo del fago. El prófago puede prevenir este emparejamiento. Otra hipótesis sería el bloqueo por el profago del proceso de síntesis de la proteína del fago, imprescindible para la maduración de la partícula infectiva del fago.

Por último, hemos de añadir que la fijación del prófago sobre el cromosoma supone su integración en el genoma de la bacteria. Su presencia, el hecho de que él esté unido al cromosoma, impediría un proceso necesario al desarrollo, no solamente del mismo profago, sino también de los fagos infectantes vecinos. Es notable que un organismo pueda perpetuar, coordinado con su propio germen, una estructura a partir de la cual un virus puede producirse, y es más notable aún que esta estructura, el virus potencial, sea el factor responsable de la inmunidad contra el verdadero virus.

Ahora bien: conocemos bien el papel de los receptores superficiales específicos en la absorción del fago. En las bacterias lisogénicas, otras estructuras de tipo específico pueden ser consideradas como posibles receptores y modificadores del material genético del fago. Este material genético, por su ligazón al receptor, podría ser convertido, reducido a profago, el cual podría él mismo modificar las propiedades del cromosoma bacteriano. El resultado de la interacción del material genético del fago y de la bacteria sería el profago, y el resultado del profago es la inmunidad bacteriana hacia el fago. Que los efectos de los genes varían con su posición en el cromosoma es cosa bien sabida; una específica estructura o partícula puede no ser considerada como tal sino en sus relaciones especiales con otras estructuras celulares. Como consecuencia del estudio de la lisogenia, el efecto de la situación es introducido en la patología bacteriana o celular. Dice Lwoff (171) que la posición es la cuarta dimensión del profago.

VII. BIBLIOGRAFIA

(1) Twort. An investigation the nature of ultra-microscopic viruse. Lancet. 2, 1241-1243. 1915.

(2) D'Herelle. Le bacteriophage et son comportement. Masson et C. 1926.

(3) Gilmetter. Ueber das d'Herelle'sche. Phanomen. Berlin Klin. Woch. 58, 1355-1358, 1921.

(4) Otto y Munter. Zum d'Herelle'sche Phanomen. Deut. Medic. Woch. 47, 1579-1581, 1921.

(5) Bordet. Le probleme de l'autolyse microbienne dans la genese de la lyse transmissible. Comp. Ren. S. Bio. 88, 1211-1213, 1923.

(6) Bail. Elemental bakteriophagen des Shiga Bazillus. Wien. Klin. Woch. 35, 722-724, 1922.

(7) Lisbonne y Carrere. Obtention du principe lytique pour le b. Shiga par culture filtrie de B. coli. Com. R. S. Bio. 88, 574-576, 1923.

(8) Gildemeiter y Herzberg. Zur Theorie der bacteriophage. 6. Mitteilung uber das d'Herelle Phanomen. Zeit. Bak. 93, 402-420, 1934.

(9) Bordet y Renaux. L'autolysè microbien transmisible ou le bacteriophage. Anna. Inst. Pasteur. 32, 1283-1335, 1928.

(9 a) Bordet. The Theories of the bacteriophage. Proc. Roy. Soc. Bio. 107, 398-417, 1931.

(10) Burnet y Mackie. Observations on a permanently lysogenic strain of B. enteri. Guarner. Austral. J. Exp. Med. Sc. 6, 277-284, 1929.

(11) Burnet y Lush. Induced ly sogenicity and mutation of bacteriophage whithin lysogenic bact. Austral. J. Exp. Bio. Med. Sci. 14, 27-28, 1936.

(12) Wollmann. Bacteriophagie et processus similaires heredité on infection? Bull. Inst. Pasteur. 26, 1-14, 1928.

(13) Wollman. Bacteriophagia et bacteriophages. Bull. Ins. Pasteur. 32, 945-955, 1934.

(14) Wollmann, E. y Wollmann, S. Regeneration des bacteriophages chez le B. megatherium lysogene. Com. R. So. Biol. 122, 190-192, 1936.

(15) Wollmann y Wollmann. Les phases des bacteriophages. Com. A. So. Biol. 124, 931-934, 1937.

(16) Doermann. Intracelular growth of Bacteriophage: Carnegie Ins. Wass. Year Book, n.º 47, págs. 176-182, 1948.

(17) Northrop. Increase in bacteriophage and gelatinase concentration in cultures of B. megatherium. J. Gen. Phy. 23, 59-79, 1938.

(18) Lwoff. Gutmann. Recherches sur un B. megatherium lysogene. An. Ins. Pasteur. 78, 711-739, 1950.

(19) Luria. General virologia. Ed. Chapmann and Hall. Londres, 1953.

(20) Ruska. Uber ein neues beider bakteriophagen lyse auftretendes gonelément. Naturwiss. 29, 367-368, 1941.

(21) Luria y Anderson. The identification and characterization of bacteriophage with electron microsco. Pro. Nat. Aca. Sc. 28, 127-130, 1942.

(22) Demerec y Fano. Bacteriophage resistan mutants in Ench. coli. Genetic. 30, 119-136, 1945.

(23) Delbruck. Bacterial virus of bacteriophages. Biol. Rev. 21, 30-40, 1946.

(24) Luria, Delbruck y Anderson. Electron microscope studies of bacteri viruses. Jour. Bact. 53, 149-163, 1943.

(25) Wyckoff. Electron Microscopy, interscience. N. Y. 1949.

(26) Luria y Williams. Electron micrographic counts of bacteriophage particles. Jour. Bac. 61, 179-188, 1951.

(27) Hook, Beard, Shorf. Isolation and characterization of the T2 bacteriophage of E. coli. Jour. of Biol. Chem. 165, 241-257, 1946.

(28) Kerby, Gowdy, Dielon, Csaky, Sharp, Beard. Purification pH stability and sedimentation properties of the T7 bacteriophage of E. coli. Jour. of Im. 63, 93-107. 1949.

(29) Williams y Fraser. Jour. Bac. 66, 458-464, 1953.

(30) Anderson, C. Rapport y Muscatine. On the structure and osmotic properties of phage particles. Le bacteriophage. Pre. Colloque Interna. Royaumont, pág. 4, 1952.

(31) Anderson. Morphological and clinical relations in viruses and bacteriophage. Cold. Spring Harbor Sympo. Quant. Biol. 11, 1-13, 1946.

(32) Anderson. Boggos, Winters. The Relative sensitivity of bacteriophage to intense sonic vibration. Science. 108, 18, 1948.

(33) Adams. The stability of bacterial viruse in solutions of salts. J. Gen. Physio. 32, 579-594, 1949.

(33 a) Watson y Crick. Genetical implication of the structure of desoxyribonucleic acid. Nature. 171, 964-996, 1953.

Watson y Crick. The estructure of DNA viruses. Vol. XVIII, del Cold. Spring Harbor Symposium on Quan. Biol. Provirus. 1953.

(34) Cohen y Arbogast. Chemical studies in host-virus interaction. J. Exp. Med. 91, 607-618, 1950.

(35) Hershey y Chase. Independent function of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 36, 39-56, 1952.

(36) Evans. The origen of the components of the bacteriophage particle. Le bacteriophage. Premier colloque international. Royamont, pág. 129, 1952.

(37) Polson y Wyckoff. The amino acid content of bacteriophage. Scien. 108, 501, 1948.

(38) Hershey, Kamen, Kennedy y Gest. The mortality of bacteriophage containing assimilated Radioactive phosphorus. J. Gen. Physiol. 34, 305-319, 1951.

(39) Wyatt y Cohen. A new pyrimidine-base from bacteriophage nucleic-acids. Nature. 170, 1072-1073, 1952.

(40) Herriot. Nucleid-acid-free T2 virus «ghots» with specific biological action. Jour. Bac. 61, 752-754, 1951.

(41) Kalmanson y Bronfenbrenner. Reetoration of activity of neutralized biologic agents by removal of the antibody with papain. J. Imm. 47, 387-407, 1943.

(42) Andrew y Elford. Observations on antiphage sera. I. The «percentage law». Br. J. Ex. Path. 14, 367-376, 1933.

(43) Anderson y Doermann. Sonic reactivation of anti-serum-neutralized bacteriophage T3. J. Bact. 63, 291-293, 1952.

(44) Delbruck. Effects of specific antisera on the growts of bac. viruses. Jour. Bact. 50, 137-150, 1945.

(45) Burnet. The phageinactivating agent of bacterial extracts. J. Path. Bac. 38, 285-299, 1934.

Burnet y Freeman. A comparative study of the inactivation of a bacteriophage by immune serum and by bacterial polyscharide. Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 15, 49-61, 1937.

Burnet, Keogh y Lush. The immunological reactions of the filtrable viruses. Austral. J. Exp. Biol. Me. Sc. 15, 227-268, 1937.

(46) Tiffany y Rakieten. The absoption of bacteriophage by sesitived enterococci Jour. Bact. 37, 333-349, 1939.

(47) Pirie. The effect of lysozyme on the union between a phage and the susceptible B. megaherium. Brit. J. Ex. Path. 21, 125-132, 1940.

(48) Levine y Frisch. New heat-stable agglutinogens in the suipertifer group. Pro. Soc. Exp. Bio. Med. 32, 883-886, 1935.

(49) Sievers. Ein neuer Salmonellatype «Koln» durch Phagendiagnostik ermittelt. Zen-Bak. 150, 52-53, 1943.

(50) Rakieten, M. L. y Rakieten, T. L. Relations between staphylococci and B. belonging to the subtilis group as shown by bacteriophage absorption. Jour. Bac. 34, 285-300, 1937.

(51) Alexander y Leidy. Determination of inherited traits of H. influenzae by desoxyribonucleic acid fractions isolated from type-specific cells. J. Exp. Med. 93, 345-359, 1951.

(52) Luria, Demars, Fisher, Levithal. The production of incomplete bacteriophage particles by the action of proflavine and the properties of the incomplete particles. An. Ins. Pasteur. 84, 113-128, 1953.

(53) Lanni, F. y Lanni, Y. T. Antigenic structure of bacteriophage T2. Fed. Pro. 12, 450-451, 1953.

(54) Delbruck y Luria. Interference between bacterial virus. I. Interference between two bac viruses acting upon the same hast and the mechamism of virus growth. Arch. Bioch. I, 111-141, 1943.

(55) Delbruck. Interference between bact. viruses. III. The mutual exclusion effect and depressor effect. J. Bact. 50, 151-170, 1945.

(55 a) Weigle y Delbruck. Mutual exclusion between an infecting phage and a carried phage. J. Bact. 62, 301-318, 1951.

(55 b) Jacob. Developpement spontané et induit desbacteriophages chez des Pseudomonas pyocyanea polylysogenes. Ann. Ins. Pasteur. 83, 371, 692, 1952.

(55 c) Kellemberger. La lysogenie d'une souche de B. cereus-mise en evidence par le micros. electronique. Rev. Suis. patho. gen. bac. 15, 225-233, 1952.

(56) Ellis y Delbruck. The growth of bacteriophage. J. Gen. Phys. 22, 365-384, 1939.

(56 a) Delbruck. The burst size distribution in the growth of bac. viruses. J. Bac. 50, 131-135, 1945.

(57) Garen y Puck. The first two steps of the invasion of host cells by bact. viruses. J. Exp. Med. 94, 177-189, 1951.

(58) Garen, Puck y Cline. The mechanism of virus attachmentto host cells. J. Exp. Med. 93, 65-88, 1951.

(59) Delbruck. Biochemical mutants of bac. viruses. J. Bac. 56, 1-16, 1948.

(60) Stent y Wollmann. Studies on activations of T4 bacteriophage by cofactor. Bioch. Biophy. Acta. 6, 307-316, 1950.

(60 a) Anderson. The activation of the bacterial virus T4 by L-tryptophan. J. Bac. 55, 637, 1948.

(60 b) Anderson. On the mechanism of adsorption of bacteriophages on host cells. Capítulo V del Symposium sobre The nature of the Bact. Surgace. 1949.

(61) Delbruck. Bacterial viruses. Advances in Enzymology. 2, 1, 1942.

(62) Goebel y M. A. Jesaitis. Chemical and antiviral properties of the somatic antigens of phase II «Sh. Sonnei» and of a phage-resistant variant 11/3, 4, 7. La Bacteriophage. Premier Colloque International, pág. 66, 1952.

(63) Felix. Symposium on the nature of virus multiplication. Contribution to discusion Society for General Microbiology. Oxford, 1952.

(64) Beumer. La specificité de la fixation des phages sur les recepteurs microbien. Ans. Ins. Pasteur. 84, pág. 15, 1953.

(65) Miller y Goebel. Studien on bacteriophage. J. Ex. Med. 90, 255-265, 1949.

(66) Weidel. Uber die Zellmembran von Ech. coli B. Z. Naturforsch. 6b: 251-259, 1951.

(66 a) Visconti. Genetics of bacteriophages. Ann. Ins. Pasteur. 84, 180-185, 1953.

(67) Cohen. Growth requirements of bacterial viruses. Bacteriological Reviews. 1, 1-24, 1949.

(68) Doermann. The intracellular growth of bacteriophages. J. Gen. Physiol. 35, 645-656, 1952.

(69) Hershey. Intracellular phases in the reproductive cycle of bacteriophage T2. Le Bacteriophage premier colloque international, pág. 99, 1952.

(70) Delbruck, The growth of bacteriophage and lysis of the host. J. Gen. Physiol. 23, 643-660, 1940.

(70 a) Doermann. Lysis and lysis inhibition with E. coli bacteriophage. J. Bac. 55, 257-276, 1948.

(70 b) Heagy. The effect of 2,4,dinitrophenol and phage T2 on E. coli. J. Bac 59, 367, 394, 1950.

(70 c) Anderson. On a bacteriolytic subtance associated with a purified bacteria virus. J. Cell. Com. Physiol. 25, 1-13, 1945.

(70 d) Watson. The biological properties of X-ray inactivated bacteriophage. Ph. D. Thesis, Indiana University, 1950.

(71) Fraser. Bursting bacteria by release of gas presure. Nature, 167, 33-34. 1951.

(72) Foster. The action of proflavine of bacteriophage growth. J. Bac. 56, 795-809, 1948.

(73) Levinthal y Fischer. The structural development of a bacterial virus. Bioch. Biophy. Acta. 9, 419-429, 1952.

(74) Maaloe y Symods. Radioctive sulfur tracer studies, on the reproduction T4 bacteriophage. J. Bac. 65, 177-182, 1953.

(75) Putnam y Kozloff. Biochemical studie of virus reproductions. III. The origen of virus phosphorus in the E. coli T6 bacteriophage systems. J. Biol. Chem. 182, 229-242, 1950.

(75 a) French. The contribution of protein from parent to progeny in T2 coliphage. Jour. Bac. 67, 45-49, 1954.

(75 b) Putmann, Kozloff y Evans. Precurssors of bacteriophage nitrogen and carbono. Viruses. Pasadena. California, pág. 55, 1950.

(76) Maaloe y Watson. The transfer of radioactive phosphorus from parental to progeny phage. Proc. Nat. Aca. Sci. 37, 507-513, 1951.

(77) Kozloff. Jour. Biol. Chem. 194, págs. 83-194, 1952. Citado en Hershel. Intracelullar phase in the reproductive cycle of bacteriophage T2. Ann. Ins. Pasteur. 84, 99-112, 1953.

(78) Weed y Cohan. The utilization of host pyrimidines in the sythesis of bacterial viruses. J. Biol. Chem. 192. 693-700. 1951.

(79) Cohen. The synthesis of nucleic-cid by virus-infected bacteria. Bact. Rewiev. 15, 131-146, 1951.

(80) Koch. Citado en trabajo de Evans (cita 36).

(81) Cohen. The synthesis of bacterial viruses in infected cells. Cold Spring Harbor Sympo. Quant. Biol. 12, 35-49, 1947.

(82) Siddigi, Kozloff, Putmann y Evans. J. Biol. Chem. 199, 165, 1952.

(83) Maaloe y Stent. Radiactive phosphorus tracer studies in the reproduction of T4 bacteriophage. Acta. Path. Microb. Scan. 30, 149-157. 1952.

(84) Kock, Putmann y Evans. J. Biol. Chem. 197, 105, 1952.

(85) Labaw. The origen of phosphorus in Ech. coli bacteriophage. J. Bac. 62, 169-173, 1951.

(86) HERSHEY, DIXON y CHASE. Nucleic acid economy in bacteria infected with bacteriophage T2. J. Gen. Physiol. 36, 777-789, 1953.

(87) MONOD y WOLLMANN. L'inhibition le la croissance et de l'adaptation enzymatique chez les bacteries infectees par le bacteriophage. Anna. Ins. Pasteur. 73, 937-957, 1947.

(88) PARDEE y WILLIAMS. Enzymatic activity and bacteriophage infection. Ann. Ins. Pasteur. 84, 147-156, 1953.

(89) KOZLOFF. Dexosyrebonucleiasa inhibitor and bacteriophage infection. Fed. Proc. 12, 234, 1953.

(90) GRAHAN. The fate of the infecting phage particle. La bacteriophage. Premier Colloque international, pág. 90, 1952.

(91) FOWLER y COHEN. Chemical studies in host-virus interacetions. IV. O. method of determinig nutritional requeriments for bacterial virus multiplication. J. Exp. Med. 87, 259-274, 1948.

(92) FOWLER y COHEN. Chemical studies in host-virus interactions. V. Some additional methods of feterminiany nutritonal for virus multiplication. J. Exp. Med. 87, 275-282, 1948.

(93) SPIZIZEN. Biochemical studies on the phenomenon of virus reproduction. I-A-mino-acids and the multiplication of bacteriophage. J. In. Dis. 73, 212-221, 1943.

(94) DELBRUCK y LURIA. A comparison of the action of sulfa-drug on the growth of a bacterial virus and of its host. Proc. Indiana Acad. Sci. 53, pág. 28, 1944.

(95) COHEN y FOWLER. Chemical studies on host-virus interactions. III. Tryptophane requirements in the stages of virus multiplication in the E. coli T2 bacteriophage system. J. Exp. Med. 85, 771-784. 1947.

(96) LURIA y HUNMAN. Chromatin staining of bact. during bacteriophage infection. Jour. Bac. 53, 149-163, 1950.

(97) MURRAY y GILLEN, HEAGY. Cytological changes in E. coli produced by infection with phage T2. J. Bac. 59, 603-615, 1950.

(98) NEUTNER, HARTMANN, DUDD y HILLIER. Light and electron microscopic studies of E. coli-coliphage interactions. I: Preparative method comparative light and electron microscopic cytology on the E. coli T2 System. Bioch. Biophyca Acta. 10, 143-152, 1953.

NEUTNER, HARTMANN, MUDD y HILLIER. II: The electron microscopic cytology of the E. coli B-T2 system Bioch. Biophysi. Acta. 10, 153-179, 1953.

(99) HERRIOT. Nucleic acid Synthesis in mustard gas treated E. coli B. J. Gen. Phys. 34, 761-764, 1951.

(100) LURIA. Bacteriophage: An essay in virus reproduction. Sciencia. 111, 507-511, 1950.

(101) SIMINOVICHT y RAPKINE. Modifications biochimiques au cours du developpement des bacteriophages chez une bacterie lysogene. C. Ren. Acad. Sc. 232, 1603-1605, 1951.

(102) BEATO (F.). El problema de la herencia de las bacterias. Recientes adquisiciones en genética bacteriana. Medicina Española, núms. 160, 161, 162 de 1952. Abundante bibliografía.

(103) LURIA. Mutation of bacteria viruses affecting their host range. Genetic. 30, 84-99, 1945.

(104) HERSHEY. Mutations of bacteriophage with respect to type. Genetic. 31, 620-640, 1946.

(105) DOERMANN. Lysis and lysis inhibitions vith Sch. Coli bacteriophage. J. Bact. 55, 257-276, 1948.

(106) LURIA. Reactivation of irradiated bacteriophages by transfer of self-reproducing units. Proc. Nat. Acd. Sci. 33, 253-264, 1941.

(107) LURIA. The frequency distribution of spontaneous bacteriophage mu-

tants as evidence for the exponential rate of phage reproduction. Cold Spring Harbor-Sympo. Quant. Biol. 16, 463,470, 1951.

(108) Visconti y Delbruck. The Mechanism of genetic recombination in phage. Genetics. 38, 5-33, 1953.

(109) Luria y Delbruck. Mutations in bacteria from virus sesivility to virus resistance. Genetics. 28, 491-511, 1943.

(110) Anderson. Incidence of metabolic changes among virus-resistents mutants of a bacterial strain. Proc. Na. Acd. Sci. So. 30, 394-403, 1944.

(11) Beadley y Sturberant. A introduction to genetic. Edi. por Saunder, página 33, 1939.

(112) Boyd. Mutation in a bacterial virus. Nature. 168, 994-995, 1951.

(113) French, Lesley, Graham, Van Rooyen. Studies of relationship between virus and host cell. Canada Ned. Sci. 29, 144-148, 1951.

(114) French, Grahan, Lesley, Van Rooyen. The contribution of phosphorus from T2+ bacteriophage to progeny. Jour. Bac. 64, 597-607, 1952.

(115) Delbruck y Bailey. Induced mutations in bacterial viruses. Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol. 11, 33-37, 1946.

(116) Luria. Type hybrid bacteriophages. Records Genetic Sos. Ame. 18, 102, 1949.

(117) Dulbecco. Mutual exclusion between related phages. J. Bac. 63, 209-217, 1952.

(118) Delbruck. Interference between bacterial viruses. J. Bac. 50, 151-170, 1945.

(119) Adams. The calcium requirement of coli phage T5. J. Immu. 62, 505-516, 1949.

(120) Watson. The biological properties of X-rays inactivated bacteriophage. Ph. D. Thesis Indian University. 1950.

(121) Weigle y Delbruck. Mutual exclusion between an infecting phage and a carried phage. J. Bac. 62, 301-318, 1951.

(122) Hershey. Spontaneous mutation in bacterial virus. Cold Spring. Harbor Sympos. Quant. Biol. 11, 67-76, 1946.

(123) Hershey y Rotmann. Linkage among gene controlling inhibition of lysis in a bacterial virus. Pro. Nat. Acd. Sci. 34, 89-96 ,1948.

(124) Hershey y Rotmann. Genetic recombination between host range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacte. cells. Genetics. 34, 44-71, 1949.

(125) Doermann y Hill. Genetic structure of bacterial phage T4 as described by recombination studies of factors influencing phage morphology. Genetics. 38m. 79-90, 1953.

(126) Bresch. Genetical studies on bacteriophage T1. Ann. Ins. Pasteur. 84, 157-168, 1953.

(127) Levinthal. Recombination in phage, ist relationship to heterozygosis and growth. Genetics. Citado en Luria, General Virology, pág. 293, 1953.

(128) Watson. The properties of X-ray inactivated bacteriophage. J. Bac. 60, 697-718, 1950.

(129) Luria y Delbruck. Interference between inactivated bac. virus and active virus of the same strain and of a different strain. Arch. Bioch. 1, 207-218, 1942.

(130) Dubelko. Reactivation of UV-inactivated bacteriophage by visible light Nature. 163, 949, 1949.

Dubelko. Experiments on photoreactivation of UV-inactivated bacteriophage. J. Bact. 59, 329-347, 1950.

(131) Bowen. Kinetic studies on the mechanism of photoreactivation of bacteriophage T2 inactivated by UV. Ann. Ins. Pasteur. 84, 218-221, 1953.

(132) Luria y Dulbecco. Genetic recombination leading to production of active bacteriophage particles. Genetics. 34, 93-125, 1949.

(133) Dulbecco. A critical test of the recombination theory of multiplicity reactivation. J. Bac. 63, 169-207, 1952.

(134) Luria y Laterjet. Ultravioletirradiaction of bacteriophage during intra cellular growth. J. Bac. 53, 149-163, 1947.

(135) Beuzer. Resistance to ultraviolet light as an index to the reprodoction of bacteriophage. J. Bact. 63, 59-72, 1952.

(136) Beuzer y Jacob. Etude du leveloppement du bacteriophage au moyen d'irradiations par la lumiere ultra-violette. Ann. Ins. Pasteur. 84, 186-204, 1953.

(137) Novick y Sziherd. Virus strain of identical pheno-type bac. different genotype Sciencia. 113, 34-35, 1951.

(138) Luria y Human. A non hereditary host-induced variation of bac. viruses. J. Bac. 64, 557-569, 1952.

(139) Weigle y Bertani. Variations des bacteriophages conditionnees par les bacteries hotes. Le Bacteriophage. Primer Coloquio Internacional, pág. 175, 1953.

(140) Bertani y Weigle. Host-controlled variation in bacterial viruses. J. Bac. 65, 113-121, 1952.

(141) Burnet. The bacteriophages. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 9, 332-35, 1934.

(142) Bronfenbrenner. Virus disease of bacteria: Bacteriophagy, págs. 373-413, en el tratado de Rivers «Filterable virus», 1928.

(143) Gratia. Le phenomene du halo et la synergie des bacteriophages. Com. R. Soc. Biol. 126, 418-421, 1939.

(144) Anderson. On a bacteriolic substance associated with a purified bac. virus and cell. Comp. Phy. 25, 1-15, 1945.

(145) Fredericq. Colicines et bacteriophages. Ann. Ins. Pasteur. 84, 294-312, 1953.

(146) Bordet. Rev. Imm. 2, 323, 1947 (citado por Fredericq, 145).

(147) Jacob, Siminovitch, Wollmann. Sur la biosyntesis d'une colicine et sur son mode d'action. Ann. Ins. Pasteur. 83, 295-315, 1953.

(148) Lanni y Lanni. Antigenic structure of bacteriophage T2. Federation Proc. 12, 450, 451, 1953.

(149) Jacob, Lwoff, Siminovitch, Wollman. Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie. Ann. Ins. Pasteur. 84, 22-224, 1953.

(150) Jacob, Siminovitch, Wollman. Comparation between the induced biosynthesis of colicine and of bacteriophage and between their mode of action. Ann. Ins. Pasteur. 84, 313-318, 1953.

(150 a) Rountbe. Complement fixing antigen of bac. coli bacteriophage T5: Its behaviour during virus growth. Brit. J. Exp. Pht. 32, 341, 1951.

(151) Lwoff, Siminovitch y Kjeldgaard. Induccion de la production de bacteriophages chez une bacterie lysogene. Ann. Inst. Pasteur. 78, 815-859, 1950.

(152) Lwoff. Lysogenie. Bacteri. Reviews. 17, 269-337, 1953.

(153) Ledeberg (E. M.). Lysogenicity in E. coli K_{12}. Genetics. 36, 560, 1951.

(154) Elie Wollman. Sur le determinisme genetique la lisogenie. Ann. Ins. Pasteur. 84, 281-293, 1953.

(155) Lederberg, E. M. y Lederberg, I. Genetics studies of lysogenicity on E. coli. Genetics. 38, 51-64, 1953.

(156) Hayer. Observations on a transmisible agent determining sexual differentiation in bact. coli. J. Gen. Microb. 7, 72-88, 1953.

(156 a) Lwoff. The nature of phage reproduction. Capítulo del libro «The Nature of virus multiplication», pág. 149. Segundo Symp, of the Soc. Ge. Micro., 1952.

(156 b) Boyd. The role of mutation in the survival and multiplication, of bacterial viruses. Capítulo del libro «Nature of virus multipl.», pág. 118. Segundo Symp. for Gen. Microbi., 1952.

(157) Lederberg, L. L. Coballi y Lederberg, E. M. Genetics. 37, 720, 1952. Citado por Ellie Wollman, cita 154.

(158) Lwoff y Siminovitch. L'induction du developpement di prophage par les substances reductrices. Ans. Ins. Pasteur. 82, 676-689, 1952.

(159) Wyss, Stone y Clark. The production of mutations ins Stsph. Aureus by chemical treatment of the subtrate. J. Bac. 54, 767, 1947.

(160) Lwoff y Jacob. Induction de la production de bacteriophages et d'une colicine par les peroxydes, les ethylneinmines et les halogenoalcoylaminas. Com. R. Soc. Biol. 234, 2308-2310, 1952.

(161) Doyland. Different types of carcinogens and their possible modes of action; a review. Cancer Research. 12, 77-84, 1952.

(162) Ionesco. Systemes inductibles et no inductibles chez B. metagerium lysogene. Com-Ren. Soc. Biol. 233, 1702-1704, 1951.

(163) Lwoff. L'induction. Ann. Ins. Pasteur. 84, 225-241, 1953.

(164) Lwoff. Conditions de l'efficacité inductrice du rayonnement ultra-violet chez bacterie lysogene. Ann. Ins. Pasteur. 81, 370-388, 1951.

(165) Borek. Factors controlling aptitude and phage development in a lysogenic. E. coli K_{12}. Bioc. Biophy. Acta. 8, 211-215, 1952.

166. Jacob. Influence de regime carboné sur le developpement des bacteriophages chez un Pseudo. pyocyanea. Ann. Ins. Pasteur. 82, 578-602, 1952.

(167) Huybers. Cationic reversion of induced phage development in B. megatherium. Ann. Ins. Pasteur. 84, 242-253, 1953.

(168) Butler, Pres y James. The action of nitrogen mustards on desoxyribonucleic acid. II Congreso Inter. de Bioch. París, pág. 462, 1952.

(169) Boyd. Observations on the relationship of symbiotic and lytic bacteriophage. P. J. Pathol. Bacteriol. 63, 445-457, 1951.

(170) Murphy. Mutants of a bacteriophage of M. megatherium. J. Exp. Medi. 96, 581-588, 1952.

(171) Bertani. Infections bacteriophagiques secondaires des bacteries lysogenes. Ann. Ins. Pasteur. 84, 273-280, 1953.

(172) Lieb. The establishment of lysogenicity in E. coli J. Bac. 65, 642-651, 1953.

(173) Smith. Investigations on the typing of staphylococci by means of bacteriophage. I. The origen and nature of lysogenic strains. II. The significance of lysogenic strains in staphylococci type designation. J. Hygiene. 40, 74-81, 1948.

(174) Dooren de Jonc. Studien uber Bakteriophagie. Ueber B. megatherium und den darin anwesende bakteriophagen. Gen. Bak. Org. 120, 1-15, 1931.

(175) Clarke. Studies in the host-virus relationship in a lysogenic strain of B. megaterium. II. The growth of B. megatherium in synthetic medium. Jour. Bacter. 63, 187-192, 1952.

(176) Nicolle, A. Jude y G. Diverneam. Antigenes entravant l'action de certain bacteriophage. Le Bacteriophage, primer coloquio Internacional, pág. 29. Royaumont, 1952.

(117) Jacob y Wollmann. Induction of phage development in lysogenic bacteria. Cold. Spring Harbor Sympo. Quant. Biol., vol. 19, 1954.

RENOVACION DE DIRECTIVA

En la sesión celebrada por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 15 del corriente mes de junio se efectuó el escrutinio de los votos recibidos para la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva.

En consecuencia, la Junta ha quedado constituída de la manera siguiente:

Presidente: Don Arnaldo Socias Amorós.
Vicepresidente: Don Gerardo Clavero del Campo.
Secretario: Don Lorenzo Vilas López.
Tesorero: Don Miguel Benlloch Martínez.
Bibliotecario: Don Ricardo Salaya León.
Vocales: Don Genaro Alas Cores.
Don Gabriel Colomo de la Villa.
Don Eduardo Gallardo Martínez.
Don José García Bengoa.
Don Emilio Luengo Arroyo.
Don Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez.
Don Florencio Moreno de Vega Soler.

VII CONGRESO I. DE MICROBIOLOGIA

En la Sociedad de Microbiólogos Españoles se ha recibido últimamente carta del profesor G. Penso, secretario general de la Asociación Internacional de las Sociedades de Microbiología, comunicando que el próximo Congreso Internacional de Microbiología (VII) tendrá lugar en Estocolmo, en el mes de agosto de 1958. Presidente y secretario serán, respectivamente, el profesor Sven Gard, del «Karolinska Institutet», de Estocolmo, y el doctor Carl Goran Hedén.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

Acta de la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 25 de noviembre de 1955.

Bajo la presidencia de don Gerardo Clavero del Campo y actuando como secretario don Lorenzo Vilas, se abre la sesión a las 20,30 horas en la sala de actos del Instituto «Daza de Valdés», de Optica, del C. S. I. C., Serrano, 121.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. Son admitidos como socios de número: don Manuel Rosell Pérez, farmacéutico, de Valencia, presentado por don Lorenzo Vilas y la señorita Eulalia Cabezas de Herrera; don Manuel Ignacio Candela Martínez, químico, de Madrid, presentado por don Lorenzo Vilas y la señorita Genoveva Tejerina; don Casildo Martínez Crespo, farmacéutico, de Madrid, presentado por don Lorenzo Vilas y la señorita Eulalia Cabezas de Herrera, y don Manuel Santaolalla Cerezo, farmacéutico, de Madrid, presentado por don Lorenzo Vilas y la señorita Ramona Beltrá.

La señorita Beltrá presenta una comunicación sobre «Método selectivo para la identificación de bacterias fitopatógenas y en especial de la *Pseudomonas savastanoi*», y la señorita Aparicio otra acerca de «Estudio del *corn steep* y su influencia en la fermentación alcohólica». El señor Clavero del Campo hace resaltar el interés de ambas comunicaciones. El señor Rodríguez Villanueva da a conocer «Un nuevo método microbiológico de valoración de vitamina B_1», método del que hace unos comentarios elogiosos el señor Moreno López. Por último, el señor Clavero del Campo da cuenta de que próximamente se verificarán elecciones para la designación de nuevo Presidente.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las 21,40 horas.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES».—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

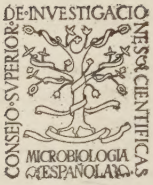
Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE D ESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 144 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

A. LOBO. - Libertad, 33 - Teléf. 21 31 61 - MADRID


CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA